

Universidad Autónoma de Madrid

FACULTAD DE MEDICINA



Programa de doctorado en
Biociencias Moleculares

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON RITUXIMAB EN LAS POBLACIONES
LINFOCITARIAS DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA EN PACIENTES CON
ARTRITIS REUMATOIDE**

Jorge López López

Madrid, 2019



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON RITUXIMAB EN LAS POBLACIONES
LINFOCITARIAS DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA EN PACIENTES CON
ARTRITIS REUMATOIDE**

Jorge López López

Bioquímico

Trabajo dirigido por:

Cecilia Muñoz Calleja e Isidoro González Álvaro

En el Hospital Universitario de La Princesa
Madrid, 2019

A mi familia.

*A mi mujer, mis hijos
y mis padres, gracias por tanto.*

AGRADECIMIENTOS

Hace varios años, cuando soñaba con realizar mi tesis doctoral, dejando volar mi imaginación, pensaba en el momento de escribir los agradecimientos. Eso supondría que mi tesis estaría prácticamente terminada y que estaría a punto de conseguir mi sueño. Pues bien, ese momento ya ha llegado. Vaya de antemano mi agradecimiento a compañeros de trabajo, amigos y familiares a los que por razones obvias no puedo nombrar. ¡Muchas gracias!

Muchas gracias a mi mujer, Mireia. Sin ti esto no habría sido posible. Siempre me has animado y dado fuerzas para conseguir las cosas que me propongo. Terminar la tesis doctoral con dos hijos mellizos de un año, no ha sido nada fácil, pero por supuesto que ha sido posible gracias a tu ayuda y tu grandísimo esfuerzo. Gracias.

A mis dos pequeñajos, Pablo y Álvaro, aun no os enteráis de nada, pero no sabéis la fortaleza y las ganas de hacer bien las cosas que me dais. Espero que algún día podáis sentir el esfuerzo que vuestra madre y yo hemos realizado para conseguir esta meta. Sería feliz si algún día llegais a aprender que con ganas y esfuerzo se puede conseguir todo lo que uno se propone en la vida. Gracias.

A mi familia y en especial a mis padres. Mama, Papa, siempre habéis dado el máximo por mí, siempre me habéis inculcado el valor del esfuerzo y la constancia. No dudéis que sin vosotros yo no habría conseguido muchas de las cosas que he conseguido en la vida. Gracias.

A mis amigos que tanto animo me han dado y tantas veces me han alentado para continuar en momentos en los que flaquean las fuerzas. Especialmente quiero acordarme de mis hermanos, Sara y Tundi, gracias por estar ahí siempre que os he necesitados. Vosotros hacéis real la palabra amistad. Guiller, estamos muy lejos pero siempre has sido un ejemplo para mí. Gracias por ser como eres. Rober y Nacho, gracias por muchas cosas pero en especial por acogerme en vuestras casas durante este periodo, venir a trabajar en la tesis ha sido mucho más divertido gracias a vosotros. A todos, gracias.

A mis compañeros de trabajo durante mis años de residencia en el Hospital de La Princesa. Residentes, técnicos y adjuntos. De todos y cada uno de vosotros me llevo algo bueno. En especial me gustaría agradecer a Ana y Víctor por enseñarme tanto de citometría y por acogerme tan bien desde que entre en el hospital. A Carlos, Manu, Sara, Alicia, Alberto, Eva, Álvaro, Fede y Ana, ha sido un auténtico placer trabajar con cada uno de vosotros. Pero especialmente a mis dos residentes pequeñas, Bea e Itxaso, habéis sido mis compañeras de trabajo y de tesis, pero sobre todo mis amigas, gracias por estar ahí en momentos de flaqueza y por hacer que las cosas fueran más fáciles. Siempre recordaré esta época. A todos, gracias.

También querría recordar y agradecer a todas las personas que han participado de alguna manera en esta tesis doctoral. A los compañeros del servido de reumatología, a Leticia, Irene, Teresa y el Dr. Santos Castañeda. A Lorena y a Manuel por vuestra gran ayuda, y especialmente a todos y cada uno de los pacientes gracias a los que se ha podido realizar este estudio. Al fin y al cabo, esta investigación es para y por vosotros. Gracias.

Y como no, mi agradecimiento más sincero a la Doctora Cecilia Muñoz y al Doctor Isidoro González.

Desde que llegue el primer día al Hospital de La Princesa, la Dra. Cecilia Muñoz me transmitió muchos conocimientos en el área de la Inmunología clínica, pero especialmente me transmitió como

Agradecimientos

la profesionalidad y el conocimiento no están reñidos con la humildad y el agradecimiento hacia el trabajo de los demás. Me ha enseñado y guiado en el proceso no solo de la realización de esta tesis doctoral, sino de muchos de los conocimientos que me permiten hoy en día desarrollarme profesionalmente. Gracias también por despertar en mí el interés por la investigación. Muchas gracias.

Posiblemente una de los mayores aciertos durante la realización de esta tesis doctoral, fue que el Dr. Isidoro se convirtiera en codirector de mi tesis doctoral. Muchas gracias por tu esfuerzo, tu dedicación y sobre todo por lo que me has enseñado durante este proceso. Muchas gracias.

Sin duda no puedo decir otra cosa a mis dos directores de tesis que muchísimas gracias por valorarme y entenderme tal y como lo habéis hecho. Habéis conseguido, gracias a vuestro esfuerzo, vuestros conocimientos, vuestro apoyo y especialmente a vuestra forma de ser, que este camino fuera mucho más gratificante de lo que nunca habría pensado.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	17
TABLAS Y FIGURAS.....	21
RESUMEN.....	27
INTRODUCCIÓN.....	31
1. INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	33
1.1. Linfocitos T	33
1.1.1. Clasificación de los linfocitos T en función de su historia de exposición antigénica	33
1.1.2. Linfocitos T CD4+	35
1.1.3. Linfocitos T CD8+	36
1.2. Linfocitos B	37
1.2.1. Desarrollo de linfocitos B	37
1.1.1. Maduración de linfocitos B.....	37
2. ARTRITIS REUMATOIDE	39
2.1. Definición	39
2.2. Epidemiología	39
2.3. Factores etiopatogénicos.	40
2.4. Clínica	42
2.5. Datos de laboratorio	42
2.6. Datos radiológicos.....	43
2.6.1. Radiología.....	43
2.6.2. Ecografía y Resonancia magnética nuclear	43
2.7. Criterios de clasificación.....	43
3. INMUNIDAD ADAPTATIVA Y ARTRITIS REUMATOIDE	45
3.1. Linfocitos T en AR.....	46
3.2. Linfocitos B en AR	47
3.3. Mediadores solubles implicados en AR.....	48
4. RITUXIMAB Y ARTRITIS REUMATOIDE.....	49
4.1. Rituximab	49

4.2.	Pauta de tratamiento de Rituximab en AR.....	50
4.3.	Efectos de Rituximab en el sistema inmunitario de pacientes con AR	50
<i>HIPÓTESIS y OBJETIVOS</i>		53
1.	Hipótesis de trabajo	55
2.	Objetivo.....	55
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>		57
1.	Pacientes	59
2.	Ciclos de tratamiento con RTX.....	62
3.	Criterios de elegibilidad y exclusión.....	62
4.	Datos recogidos	63
5.	Tratamiento.....	64
6.	Declaraciones éticas.....	67
7.	Muestra	67
8.	Materiales.....	67
9.	Métodos	68
10.	Estadística.....	74
<i>RESULTADOS</i>		75
<i>DISCUSIÓN</i>		101
<i>CONCLUSIONES</i>		113
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>		117
<i>ANEXO: PUBLICACIONES.....</i>		135

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AcMo	Anticuerpos monoclonales
ACPA	Anticuerpos anti péptidos citrulinados
ag	Antígenos
Acs	Anticuerpos
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Dispositivos Médicos
AR	Artritis reumatoide
BCR	Receptor de células B (del inglés B-cell receptor)
CD	Células dendríticas
CG	Centro germinal
CMF	Citometría de flujo
CPA	Células presentadoras de antígenos profesionales
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
DE	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
FAME	Fármacos modificadores de la enfermedad
FR	Factor reumatoide
HAQ	Health Assessment Questionnaire
HEV	Vénulas de endotelio alto (del inglés High Endothelial Venules)
HLA	Antígeno leucocitario humano (del inglés <i>Human Leukocyte Antigens</i>)
IF	Inmunofenotipo
IFN γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulinas
LB	Linfocitos B
LT	Linfocitos T
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés mucosal associated lymphoid tissues)
MO	médula ósea
NAD	Número de articulaciones dolorosas
NAT	Número de articulaciones tumefactas
OLS	Órganos linfoides secundarios
OR	<i>odds ratio</i>
PCR	Proteína C reactiva
RM	Rigidez matutina
RTX	Rituximab
SP	sangre periférica
T ^a	Temperatura

Abreviaturas y acrónimos

Tc	Linfocito T citotóxicos
TCM	Linfocitos T de memoria central
TCR	Receptor para el antígeno de los linfocitos T (del inglés T cell receptor)
T-dependiente	Respuesta timo dependiente
TEM	Linfocitos T de memoria efectores
TEMRA	Linfocitos T de memoria efectores terminales
Th	Linfocitos T colaborador o helper
TN	linfocitos T naïve
TNF	Factor de necrosis tumoral
VGP	Valoración global por parte del paciente
VSG	Velocidad de sedimentación globular

TABLAS Y FIGURAS

Índice de tablas:

Tabla 1: Características en función de su historia de exposición antigénica.....	30
Tabla 2: Criterios revisados de la ACR de 1.987.....	39
Tabla 3: Conjunto de variables y puntuación de cada una de las variables para el cómputo global.....	40
Tabla 4: citocinas relevantes en artritis reumatoide.....	44
Tabla 5: Características de los pacientes del estudio RITAR.....	54
Tabla 6: Complicaciones asociadas a la artritis reumatoide.....	55
Tabla 7: Comorbilidades.....	55
Tablas 8: Datos recogidos para la caracterización de los pacientes.....	58
Tabla 9: FAMEs concomitantes con tratamiento con RTX	60
Tabla 10: Terapias previas a rituximab.....	60
Tabla 11: Anticuerpos monoclonales para el estudio de sangre periférica de las subpoblaciones de linfocitos B y T. Se detallan los fluorocromos, casa comercial, isotipo y clon.....	62
Tabla 12: Panel de anticuerpos monoclonales para la cuantificación de linfocitos B por CMF.....	63
Tabla 13: Panel de anticuerpos monoclonales para el análisis de las subpoblaciones de linfocitos B por CMF.....	64
Tabla 14: Inmunofenotipo de las subpoblaciones de linfocitos B.....	64
Tabla 15: Panel de anticuerpos monoclonales para análisis de subpoblaciones de linfocitos T por CMF.....	66
Tabla 16: Inmunofenotipo de las subpoblaciones de linfocitos T.....	66
Tabla 17: Comparación de los datos basales de la población del estudio RITAR en el grupo sin y con estudio del inmunofenotipo (EIF).....	72
Tabla 18: Características basales de los pacientes clasificados según el número de ciclos de rituximab.....	74

Índice de figuras:

Figura 1: Subtipos de linfocitos T CD4+.....	31
Figura 2: Subtipos de linfocitos B.....	33
Figura 3: Citoquinas producidas en la sinovial reumatoide.....	43
Figura 4: Estrategia de análisis utilizada para la identificación de subpoblaciones de linfocitos B de acuerdo con su estadio madurativo según el inmunofenotipo indicado en la tabla 14.....	65
Figura 5: Estrategia de análisis utilizada para la identificación de subpoblaciones de linfocitos T según el inmunofenotipo indicado en la tabla 16.....	67
Figura 6: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos B en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3ºciclo; S2:4ºciclo y 5º ciclo; S3: 6ºciclo y superiores).....	74
Figura 7: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3ºciclo; S2:4ºciclo y 5º ciclo; S3: 6ºciclo y superiores).	75
Figura 8: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ definidas por la exposición a antígeno, en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3ºciclo; S2:4ºciclo y 5º ciclo; S3: 6ºciclo y superiores),.....	76
Figura 9: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con posible papel patogénico en AR, en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3ºciclo; S2:4ºciclo y 5º ciclo; S3: 6ºciclo y superiores).	77
Figura 10: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3ºciclo; S2:4ºciclo y 5º ciclo; S3: 6ºciclo y superiores).....	78
Figura 11: Comparación del porcentaje de linfocitos B al inicio del tratamiento y durante la repoblación de células B (3, 6 y 8 meses), A) entre pacientes sin tratamiento previo (N) y que han recibido ciclos sucesivos (S) con rituximab y B) entre pacientes tratados con 1000mg de RTX y 2000mg de RTX.	79

Figura 12: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos B en la visita inicial y durante la repoblación de las células B entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) que han recibido tratamiento con Rituximab.	81
Figura 13: Evolución de las subpoblaciones de linfocitos T en las visitas inicial, y las visitas 3, 6, 8 meses en pacientes en tratamiento con rituximab.	82
Figura 14: Evolución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ definidas por la exposición a antígeno, en las visitas inicial y visitas a 3, 6, 8 meses en pacientes en tratamiento con rituximab.	83
Figura 15: Evolución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con posible papel patogénico en AR, en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses en pacientes tratamiento con rituximab.....	84
Figura 16: Evolución de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses en pacientes tratamiento con rituximab.	85
Figura 17: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) que han recibido tratamiento con rituximab.....	86
Figura 18: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ definidas por la exposición a antígeno, en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) en tratamiento con rituximab.	87
Figura 19: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) en tratamiento con rituximab.....	88
Figura 20: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con posible papel patogénico en AR, en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) en tratamiento con rituximab.....	8
9	
Figura 21: Actividad inicial de la enfermedad en la visita T0 de pacientes que iban a recibir su primer ciclo de rituximab (Naïve; cuadros de color gris oscuro) y pacientes con al menos un ciclo previo (Sucesivos; cuadros de color gris claro) de dicho fármaco.....	90
Figura 22: Correlación entre el porcentaje de linfocitos B y sus subpoblaciones con la actividad de la enfermedad de la artritis reumatoide, evaluada con DAS28.....	91

Figura 23: Correlación entre el porcentaje de linfocitos T y sus subpoblaciones con la actividad de la enfermedad, evaluada con DAS28.92

Figura 24: Correlación entre el porcentaje subpoblaciones de linfocitos T CD4+ definidas por la exposición a antígeno, con la actividad de la enfermedad, evaluada con DAS28.....92

Figura 25: Correlación entre el porcentaje de algunas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con posible papel patogénico en AR, con la actividad de la enfermedad de la artritis reumatoide, evaluada con DAS28.93

Figura 26: Correlación entre el porcentaje de algunas subpoblaciones de linfocitos TCD8+ con la actividad de la enfermedad, evaluada con DAS28.94

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica que cursa con inflamación de las articulaciones. Rituximab (RTX) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la molécula CD20 que elimina eficazmente los linfocitos B (LB) y se ha utilizado con éxito en el tratamiento de la AR. La reconstitución de los LB tras su eliminación terapéutica con RTX reproduce la ontogenia del linaje B. Sin embargo, poco se sabe sobre los efectos de los ciclos múltiples de tratamiento en la cinética de la repoblación de los LB y sus efectos a largo plazo en el compartimento de los LB y linfocitos T (LT).

Con estos antecedentes nos propusimos comparar la cinética y calidad de la recuperación de las subpoblaciones de linfocitos B entre los pacientes en su primer ciclo de RTX y los que habían experimentado al menos uno. Asimismo, estudiamos el impacto de esta eliminación transitoria de linfocitos B en las diferentes subpoblaciones de LT.

La distribución de los diferentes subtipos de LT y LB se caracterizó por citometría de flujo multiparamétrica en la sangre periférica de 29 pacientes en el primer ciclo de RTX (ciclos naïve) y 40 pacientes en ciclos sucesivos, analizándose un total de 114 ciclos. Las muestras se obtuvieron al inicio y a los 3, 6 y 8 meses de cada ciclo.

El porcentaje de las diferentes subpoblaciones T y B en la visita basal de los ciclos sucesivos fue similar e independiente del ciclo administrado, por lo que los ciclos sucesivos se agruparon para su posterior comparación con los ciclos naïve. Los pacientes en ciclos naïve presentaban en su visita basal porcentajes más altos tanto de LB totales como de memoria. Por su parte, los pacientes de ciclos sucesivos presentaban un aumento significativo de LB transicionales comparado con los pacientes de ciclos nave. Estos hallazgos están en consonancia con las etapas madurativas de la ontogenia normal de los LB. Sin embargo, la recuperación de las diferentes subpoblaciones de LB fue similar entre los dos grupos de estudio. En otro orden de cosas, en pacientes sin tratamiento previo, el porcentaje de LB transicionales correlacionaba significativamente con la actividad de la enfermedad al inicio del estudio. En cuanto a los LT, la eliminación transitoria de LB no afecta drásticamente a sus diferentes subpoblaciones, a excepción de los LT CD4+CCR6+ y su subpoblación LT CD4+CCR6+CXCR6+ que disminuyen notablemente tras el primer contacto con RTX. De forma interesante, observamos una tendencia a la asociación entre el porcentaje de LT CD4+CCR6+CXCR6+ y la actividad de la enfermedad, especialmente en los pacientes naïve.

En conclusión, RTX induce una remodelación a largo plazo del compartimiento de LB, mientras que los ciclos múltiples de RTX no inducen efectos acumulativos en las subpoblaciones de LT y B. Los LB transicionales y los LT CD4+CCR6+CXCR6+ parecen estar asociadas con una mayor actividad de la enfermedad. Nuestros hallazgos establecen las bases para que futuros estudios puedan dilucidar si la identificación y cuantificación de estas subpoblaciones linfocitarias pueden constituir biomarcadores válidos para predecir la necesidad de un nuevo tratamiento con RTX.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic disease that leads to inflammation of the joints. Rituximab (RTX) is a monoclonal antibody directed against CD20 that significantly depletes B cells, has been successfully used in the treatment of RA.

Reconstitution of B lymphocytes after therapeutic depletion with RTX mimics the ontogeny of the B cell lineage in patients with RA. However, little is known about the effects of multiple treatment cycles on the repopulation kinetics and their long-lasting effects on the B and T lymphocyte compartments.

To address this issue, we compared the recovery capacity of B lymphocyte subsets between patients in their first RTX cycle with those who had experienced at least one treatment cycle. We also investigated the impact of this transient elimination of B lymphocytes in the different subsets of T lymphocytes.

The distribution of the different subtypes of T and B lymphocytes was characterized by multiparameter flow cytometry in the peripheral blood of 29 patients in their first RTX cycle (naïve cycles) and 40 patients in successive cycles. The samples were obtained at baseline and at 3, 6 and 8 months of each cycle.

The percentage of the different T and B subpopulations at the baseline visit in patients in successive cycles was similar and independent of the number of cycles administered. Therefore, the patients with successive cycles are presented in a single group and compared with the naïve cycle group. Patients in the naïve cycle group had a higher percentage of both total and memory B-cells at the beginning of the study whereas in the successive group the transitional B-cells were the predominant subset, as found in the normal ontogeny. However, the recovery of the different B-cell subsets was similar between naïve and successive cycles. In naïve patients the percentage of transitional B-cells at baseline visit significantly correlated with disease activity as measured by DAS28.

On the other hand, the transient elimination of B cells does not drastically affect the different subpopulations of the studied T lymphocytes with the exception of both CD4+CCR6+ and CD4+CCR6+CXCR6+ T-cells that decrease significantly after the first administration of RTX. The percentage of CD4 + CCR6 + CXCR6 + T lymphocytes in SP tended to correlate with the activity of the disease, especially in naïve patients.

In conclusion, RTX induces a long-term reshape of the B-cell compartment, whereas multiple cycles of RTX do not induce cumulative effects in the subsets of T and B lymphocytes. Transitional B-cells and CD4+CCR6+CXCR6+ T-cells seem to be associated with higher disease activity, although further studies are needed to determine whether they can be used as biomarkers to predict the need for RTX retreatment.

INTRODUCCIÓN

1. INMUNIDAD ADAPTATIVA

La inmunidad adaptativa, también llamada específica o adquirida, proporciona una defensa eficaz y especializada frente a las infecciones. El sistema inmunitario adaptativo está integrado por los linfocitos y sus productos, entre ellos los anticuerpos (Acs) o inmunoglobulinas (Ig). Los linfocitos expresan receptores que reconocen específicamente una amplia variedad de moléculas extrañas que se denominan antígenos (ag). El nexo de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa lo realizan las células presentadoras de ag profesionales (CPA), especialmente las células dendríticas y los macrófagos, que son las responsables de procesar y presentar el ag a los linfocitos T en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH)¹. No obstante, otras células como los linfocitos B pueden actuar como presentadoras de ag en determinadas circunstancias.

1.1. Linfocitos T

Los linfocitos T (LT) son células del sistema inmunitario adaptativo que reconocen ag proteínicos por la unión al receptor para el ag de los LT (TCR, del inglés *T cell receptor*) que se expresa en su superficie celular. El reconocimiento del ag por el TCR requiere que este sea previamente procesado en una CPA y sus péptidos unidos a las moléculas del CPH. Las proteínas del CPH humano se denominan ag leucocitarios humanos (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigens*) y se clasifican en las moléculas del CPH de clase I y de clase II. Las CPA que expresan CPH de clase II presentan ag (derivados principalmente de proteínas extracelulares) a los LT CD4⁺ o cooperadores (*T helper* o *Th*), ya que el correceptor CD4, expresado específicamente en dichos linfocitos, se une a la parte invariable de las moléculas CPH de clase II. Por su parte, el correceptor CD8, expresado por los LT CD8⁺ o citotóxicos (*Tc*) se une a las moléculas CPH de clase I, de forma que dichos linfocitos se activan solo por péptidos (derivados sobre todo de proteínas citosólicas) asociados a moléculas de clase I del CPH. Las moléculas del CPH de clase II se expresan de forma constitutiva en las CPA profesionales y las de clase I se encuentran en todas las células nucleadas del organismo².

1.1.1. Clasificación de los linfocitos T en función de su historia de exposición antigénica:

Linfocitos T naïve: Tras madurar en el timo, donde se realiza la eliminación de clones autoreactivos mediante el proceso de selección negativa, los LT entran en circulación en un estado de reposo, permaneciendo en fase G0 del ciclo celular. Este estado madurativo de los LT se caracteriza por expresar en la membrana celular altos niveles de la molécula de adhesión selectina L o CD62L y del receptor de quimiocinas CCR7, que les permiten su unión al endotelio de las venas de endotelio alto (HEV, del inglés *High Endothelial Venules*) de los órganos linfoides secundarios (OLS)

como los ganglios linfáticos y los tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT, del inglés mucosal associated lymphoid tissues). Este hecho permite la extravasación de los LT naïve hasta el interior de los mismos donde reconocerán su ag específico previamente procesado y presentado por una célula dendrítica. Durante este estadio celular expresan en su superficie la molécula CD45RA, que está implicada en la transducción de señal necesaria para su activación y diferenciación a LT de memoria.

Linfocitos T memoria: Una de las principales características del sistema inmunitario adaptativo es la generación de memoria inmunitaria. Los LT naïve, cuando son activados por primera vez por su ag específico, median la respuesta inmunitaria primaria, y parte de ellos se diferenciarán en linfocitos de memoria. Las respuestas inmunitarias secundarias se producen por encuentros posteriores con el mismo ag y suelen ser más rápidas, de mayor magnitud y con mayor capacidad de eliminación del ag. Ello es debido a que los LT de memoria son células de vida larga capaces de responder de manera inmediata en reexposiciones sucesivas al ag. Dentro del conjunto de LT de memoria se pueden distinguir dos subpoblaciones con diferentes funciones, localización e inmunofenotipo: los LT de memoria central (TCM) y los LT de memoria efectores (TEM)^{3, 4}.

Linfocitos T memoria central: Se localizan principalmente en los OLS. Este tipo de linfocitos posee menor capacidad de realizar funciones efectoras. Por el contrario, poseen una alta capacidad proliferativa ante una segunda exposición a su ag específico, generando de forma eficiente LT efectores. Los linfocitos TCM expresan marcadores de memoria tales como la isoforma CD45RO y ausencia de marcadores propios de células naïve tales como CD45RA, pero conservan marcadores de reclutamiento en las áreas T de los OLS, como CCR7 y CD62L^{3, 5}.

Linfocitos T memoria efectores: Una vez generados tras la activación de los LT naïve, los LT efectores abandonan los OLS, vuelven a la circulación sanguínea y migran de forma preferencial a los tejidos de la periferia para realizar ahí su función. Para ello, los LT efectores dejan de expresar CCR7 en superficie y la expresión de CD62L es más heterogénea. En cambio, expresan moléculas de adhesión tales como ligandos para las selectinas P y E endoteliales y receptores para quimiocinas inflamatorias, además de integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$, lo que facilita su reclutamiento en los tejidos inflamados. Este subtipo de LT se caracteriza por su rápida acción efectora y mayor capacidad para producir citocinas^{3, 5}.

La Tabla 1 muestra algunas características y los inmunofenotipos distintivo de linfocitos T naïve (TN: CD45RA+ CCR7+), linfocitos T de memoria Central (TCM: CD45RA- CCR7+), linfocitos T de memoria efectores (TEM: CD45RA- CCR7-) y linfocitos T de memoria efectores terminales (TEMRA: CD45RA+ CCR7-)^{3, 5}.

Tabla 1: Características en función de su historia de exposición antigénica.

Linfocitos T	Linfocitos naïve	Linfocitos Efectores o activados	Linfocitos de memoria central
Migración	preferencialmente a los ganglios linfáticos periféricos	preferentemente a tejidos inflamados	Preferiblemente a tejidos inflamados, tejidos mucosos.
Frecuencia de respuesta a antígeno	muy baja	alta	baja
Funciones efectoras	ninguna	secreción de citocinas ; actividad citotóxica	ninguna
Ciclo celular	no	si	+/-
Expresión de proteínas de membrana			
IL-2R (CD25)	baja	alta	baja
L-selectina (CD62L)	alta	baja	variable
IL-7R (CD127)	moderadamente alta	baja	alta
Moléculas de adhesión: integrinas, CD44	baja	alta	alta
Receptor de quimiocinas: CCR7	alta	baja	variable
Isiformas CD45	CD45RA	CD45RO	CD45RO; variable
Morfología	pequeña; escaso citoplasma	grande; escaso citoplasma	pequeña
Inmunofenotipo	CD27- CD45RA+ CCR7+	CD27+ CD45RA- CCR7- Terminales: CD27+ CD45RA+ CCR7-	CD27+ CD45RA- CCR7+

1.1.2. Linfocitos T CD4+

Los LT CD4+, ejercen sus funciones efectoras a través de moléculas de superficie y la secreción de citocinas capaces de activar otras células del sistema inmunitario como CPA profesionales o los LT CD8+. En función del perfil de citocinas que secretan así como de la expresión en superficie de receptores de quimiocinas se han definido varios tipos de linfocitos Th efectoras (figura 1)^{6,7}.

Linfocitos Th1: se caracterizan por secretar IFN-gamma, la citocina responsable de la mayor parte de las funciones de los Th1, que incluyen la activación de los macrófagos, necesaria para destruir microbios fagocitados, el cambio de clase de isotipo de las Ig y el aumento de la presentación antigénica^{8,9}.

Linfocitos Th2: secretan de forma característica IL-4, IL-5 e IL-13 que estimulan la síntesis de IgE y el reclutamiento de células del sistema inmunitario que eliminan los parásitos extracelulares. Las células Th2 tienen también un papel fundamental en las respuestas alérgicas^{8,9}.

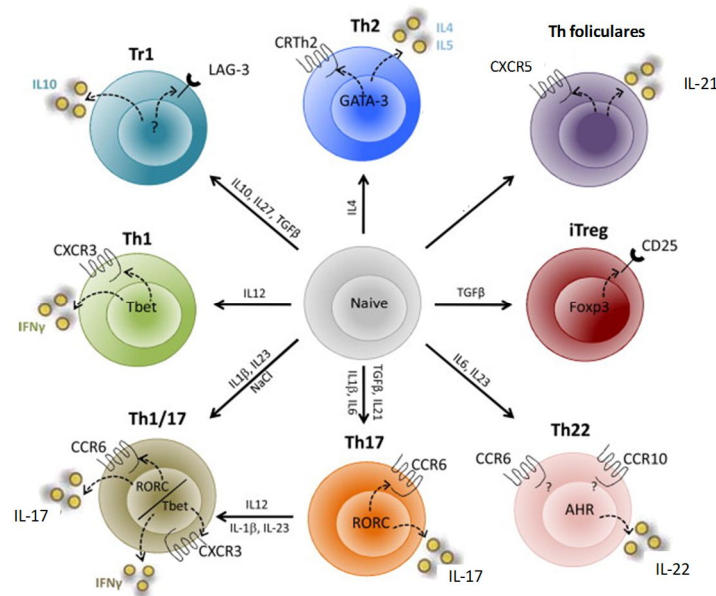
Linfocitos Th17: producen la citocina IL-17A (y otras moléculas como IL-17F, IL-21, IL-22 y CCL20), a través de la cual reclutan fagocitos y median por tanto la inflamación del tejido, con la finalidad última de eliminar bacterias y hongos extracelulares, principalmente de las superficies de las mucosas^{10,11}. Expresan característicamente CCR6 en su superficie celular.

Linfocitos Th22: se caracterizan por una abundante secreción de IL-22 pero no IL-17 o IFN- γ ¹²,^{13, 14} y expresan los receptores de quimiocinas CCR4, CCR6 y CCR10¹² y están involucrados en la protección y regeneración epidérmica.

Linfocitos T reguladores: Los LT reguladores son los encargados de moderar o suprimir la respuesta inmunitaria convencional y garantizar la tolerancia periférica a través de la inhibición de la activación y/o función de los LT autoreactivos. Se discriminan dos grandes subpoblaciones de linfocitos T CD4+ reguladores: los tímicos (antes naturales) y los periféricos (antes inducibles). Sus mecanismos de acción son variados e incluyen la secreción de citocinas inmunosupresoras, la privación metabólica o de citocinas necesarias para la célula T convencional, o la inhibición de la activación y/o función de las CPA profesionales. Poseen un fenotipo característico y defectos en su generación y/o función favorecen la aparición de patologías autoinmunes^{15, 16}.

Los linfocitos T foliculares: Los LT foliculares cooperan con los linfocitos B (LB) en la generación de Acs de alta afinidad. Expresan característicamente el receptor de quimiocinas CXCR5 e ingresan en los folículos de los OLS en respuesta a su ligando CXCL13¹⁷.

Figura 1: Subtipos de linfocitos T CD4+



Adaptada de: Geginat J et al. . *Semin Immunol.* 2013 Nov 15;25(4):252-62

1.1.3. Linfocitos T CD8+.

Los LT CD8+, denominados también LT citotóxicos, están involucrados en la protección contra los patógenos intracelulares, incluidos virus y bacterias, y en la defensa frente a tumores. Reconocen los péptidos presentados por moléculas del CPH de clase I que se encuentran en todas las células nucleadas. Generan la apoptosis de la célula diana por la unión del receptor FasL con el ligando Fas y/o por la exocitosis de moléculas como perforinas y granzimas¹⁸.

1.2. Linfocitos B

1.2.1. Desarrollo de linfocitos B

El receptor de los LB o BCR (del inglés *B-cell receptor*) está formado por una molécula de inmunoglobulina (Ig) de superficie responsable del reconocimiento específico del ag y las moléculas de señalización Ig-alfa e Ig-beta. Para garantizar la especificidad de la respuesta inmunitaria adaptativa se requiere, al igual que sucedía con los LT, un repertorio muy amplio de Ig ya que cada LB maduro solamente expresa una especificidad de ag (distribución clonal de BCR). Ello se consigue, durante la ontogenia de los LB, gracias al reordenamiento de los segmentos génicos de las Igs y la inserción de nucleótidos en las uniones de estos segmentos^{19, 20}. Dicha ontogenia tiene lugar en la médula ósea (MO) y transcurre desde el estadio de precursor linfoide común pasando por los estadios de célula pro-B y pre-B, que carecen de expresión de Ig de superficie, hasta el estadio de LB inmaduro que ya posee en su superficie un BCR funcional específico para el ag, compuesto por una IgM y las cadenas Ig-alfa e Ig-beta²¹. Es precisamente en esa etapa de LB inmaduro en la que tienen lugar los procesos de selección negativa y edición del receptor en MO, que median la tolerancia central de los linfocitos B. Posteriormente, las células B inmaduras salen de la MO y completan su desarrollo en los OLS, donde tras el encuentro con su ag específico se convertirán en LB de memoria y células plasmáticas.

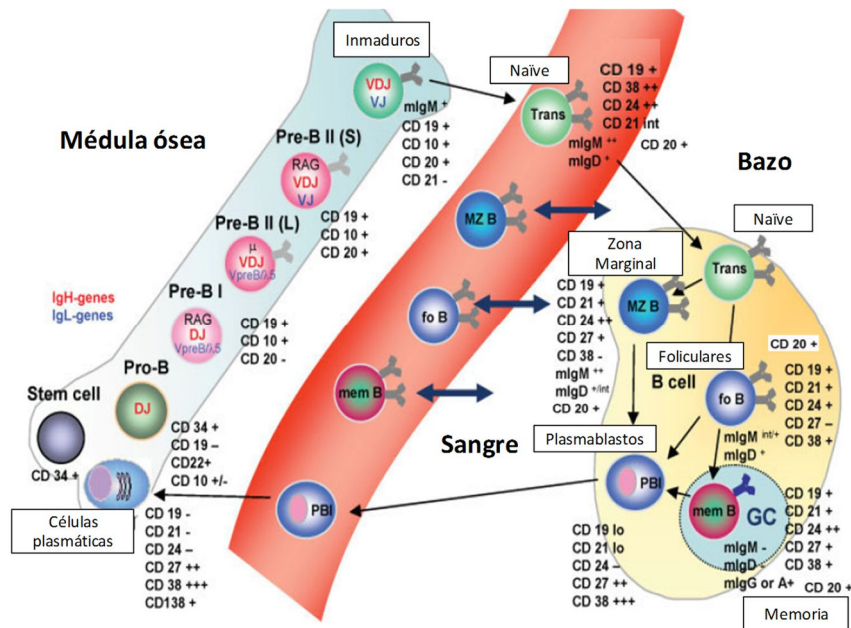
Todas y cada una de estas etapas se caracterizan por ir asociadas a un fenotipo característico que nos ayuda a identificar y cuantificar las distintas subpoblaciones B presentes en la MO y la sangre periférica (SP) de nuestros pacientes, como vemos en la figura 2. Señalar que la molécula CD20, diana del ac terapéutico Rituximab (RTX), aparece en el estadio de célula pre-B y se expresa en todos los estadios de diferenciación a excepción de la célula plasmática²².

1.1.1. Maduración de linfocitos B

Los LB inmaduros dejan la MO para recircular por el organismo. El primer estadio por el que pasan estas células es el de LB transicionales que darán origen a los dos principales linajes de células B maduras: los LB foliculares y los LB de zona marginal. Aunque no se conocen en su totalidad los mecanismos por los que los LB transicionales se diferencian hacia foliculares o marginales, se sabe que la especificidad del BCR, la disponibilidad de citocinas y el contacto con el microambiente celular, juegan un papel crucial en este proceso²³.

Los LB maduros, previo a su encuentro con el ag, se denominan LB maduros naïve, representan entre el 42-82% de los LB de SP²⁴ y expresan en su membrana IgM e IgD, ambas con la misma especificidad antigénica y sin mutaciones somáticas en la región V de su Ig de membrana.

Figura 2: Subtipos de linfocitos B



Adaptada de: Warnatz K et al. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008 Sep;74(5):261-71.

Los LB foliculares son mayoritarios, residen en nichos específicos de los OLS denominados folículos B y recirculan por los OLS, mientras que los LB marginales se localizan en los alrededores del seno marginal del bazo y los ganglios linfáticos.

Dependiendo del tipo de ag, la respuesta inmunitaria humoral que se desencadena es distinta. En la respuesta timo dependiente (T-dependiente), los LB foliculares reconocen ag proteicos en los OLS y los endocitan, procesan y asocian a moléculas del CPH de clase II. Posteriormente, migran a la región T del ganglio linfático donde presentan el ag en el contexto de una molécula del CPH de clase II a los LT CD4+ cooperadores previamente activados por el mismo péptido presentado por una célula dendrítica. Tras el contacto con el LT CD4+ correspondiente, y gracias a señales coestimuladoras como CD40/CD40L y a la secreción de citocinas, el LB vuelve al folículo y prolifera rápidamente para generar el centro germinal, donde tendrán lugar procesos fundamentales como el cambio de isotipo de la cadena pesada de sus Ig que permite la síntesis de Acs con isotipos distintos y el proceso de hipermutación somática de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras que garantiza el aumento de la afinidad de la Ig por el ag. Tras un proceso de selección positiva mediado por la presentación antigénica de las células dendríticas (CD) foliculares, los LB capaces de reconocer con alta afinidad el ag abandonan el centro germinal (CG) y se diferencian, bien a células secretoras de Acs denominadas células plasmáticas (pasando por el estadio intermedio de plasmablasto), que migran a la MO donde mantienen una larga supervivencia y su capacidad de producción de Acs gracias a la interacción con el estroma medular, bien a LB de memoria que recirculan por la SP y son capaces de responder rápidamente mediante la secreción de Acs ante una segunda exposición al Ag. Estos LB de memoria con cambio de clase o *class-switched* suponen el 6-29% de los LB circulantes²⁴.

En las respuestas T-independientes frente a ag no proteicos, los LB marginales responden rápidamente a ag extraños (generalmente polisacáridos) mediante la diferenciación en LB de memoria de zona marginal (MZL, del inglés *marginal zone like*), plasmablastos y células plasmáticas de vida media corta que secretan IgM de baja afinidad (que incluyen a los denominados ac naturales). Esta respuesta se produce en ausencia de LT cooperadores, y por tanto los LB típicamente no sufren el cambio de isotipo ni la hipermutación somática. Sin embargo, también se observan respuestas secundarias a los ags T independientes que están mediadas por los LB de memoria de zona marginal que suponen entre el 7-32% de los linfocitos B circulantes²⁴.

2. ARTRITIS REUMATOIDE

2.1. Definición

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por una sinovitis crónica que produce daño en las articulaciones y, como consecuencia, discapacidad; también pueden aparecer manifestaciones sistémicas²⁵. En la actualidad, se considera que en la patogénesis de la AR influye la interacción de factores ambientales en un huésped genéticamente predispuesto²⁶.

2.2. Epidemiología

La prevalencia mundial es de entre el 0,5% y el 1%, aunque hay una gran variabilidad siendo muy infrecuente en poblaciones africanas de raza negra y muy elevada en tribus amerindias como los Pima o Chipewa. La prevalencia es 2-3 veces mayor en el género femenino que en el masculino, y también se ha evidenciado mayor prevalencia en población urbana respecto a la rural^{27, 28}. En España el estudio EPISER (Prevalencia e impacto de las enfermedades reumáticas en la población adulta española), llevado a cabo en los años 1.988 - 1.989 evidenció una prevalencia de AR en mayores de 20 años del 0,5%, con una variación de un 0,2% en hombres a un 0,8% en mujeres y con un pico de frecuencia entre los 40 y 60 años²⁹.

En lo que respecta a incidencia anual, se estima que oscila entre 20 y 50 nuevos casos por cada 100.000 habitantes en población norteamericana y del norte o centro Europa. Aunque se considera que en países del sur de Europa es menor²⁷. En España, el estudio SERAP estimó una incidencia anual de 8'3 casos nuevos por cada 100.000 habitantes, siendo el doble en mujeres (11'3/100.000) que en hombres (5'2/100.000)³⁰.

Las tasas de mortalidad estandarizadas están en torno al 1,6-3, con una reducción de la esperanza de vida de 5-17 años^{31, 32}.

2.3. Factores etiopatogénicos.

La etiología de la AR es multifactorial y compleja³³, pudiéndose agrupar los factores etiológicos en tres grupos: genéticos, ambientales y sociales.

Factores genéticos: La agregación familiar observada en la AR hizo sospechar que esta enfermedad tenía un componente genético³⁴. En general, se estima que el riesgo achacable a la herencia para padecer AR está en torno al 50-60%. Los estudios realizados en cohortes de gemelos muestran una concordancia entre el 12 y el 15% en los monocigóticos, mientras que es de un 3,5% en los dicigóticos, en ambos casos superior a la prevalencia de la población general^{34, 35, 36}. El riesgo de padecer AR si la padece un familiar de primer grado se ha estimado en una *odds ratio* (OR) de 3, aumentando hasta una OR de 7 si existen dos familiares de primer grado afectados de AR, mientras que si la padecen familiares de segundo grado la OR es solo de 2³⁷.

El primer factor genético que se conoció que confería riesgo para padecer AR fue el locus HLA-DRB1. Ello es debido a que las variaciones en este locus tienen una frecuencia significativa en la población y efectos claramente detectables, por lo que es el único que respondería a un modelo oligogénico. En la población española se estima que la frecuencia de los alelos de este locus que se asocian a AR es de un 16.5%³⁸ y confieren una OR de 2,8 para padecer la enfermedad³⁹. La característica común de los alelos de riesgo es que codifican una secuencia de cinco aminoácidos denominada epítipo compartido, que se encuentra entre las posiciones 70 y 74 de la tercera región hipervariable de las cadenas β del HLA-DR. Esta región se corresponde con uno de los bordes de la hendidura encargada de la presentación de ag al receptor del linfocito T⁴⁰, y se ha descrito que facilitaría la presentación de péptidos citrulinados, por lo que se relaciona con el desarrollo de formas de AR seropositivas para anticuerpos anti péptidos citrulinados (ACPA), así como con mayor gravedad de la enfermedad⁴¹.

El gran desarrollo de técnicas de genotipado masivo en los últimos años ha permitido que en la actualidad se conozcan alrededor de 100 loci que confieren susceptibilidad para padecer AR⁴². De entre ellos, el otro locus con variantes que confieren riesgo elevado para padecer AR es PTPN22, cuyo gen codifica una fosfatasa de tirosina implicada en la señalización del TCR y, por tanto, de gran relevancia en la eliminación de LT autoreactivos en el timo, así como para la expansión clonal de los linfocitos T que han reconocido su ag específico⁴³. El resto de loci descritos muestran un OR pequeña, por ello se considera que el riesgo de padecer AR es esencialmente poligénico y aún queda por establecer cómo interaccionan los diferentes loci entre sí a la hora de explicar el riesgo de padecer AR. La expresión de los genes de los loci descritos con susceptibilidad para AR están implicados en

diversos eventos que implican tanto a la inmunidad innata como adquirida, aunque predominan las vías dependientes de LT CD4⁺³⁹.

Factores ambientales: Son factores que inciden sobre la base de predisposición genética para iniciar el proceso autoinmune de la enfermedad.

Tabaquismo: Vassey *et al* sugirieron por primera vez su implicación hace más de 20 años⁴⁴ y a día de hoy se le reconoce como el factor de riesgo no genético de mayor importancia en el desarrollo de AR, especialmente las formas positivas para ACPA^{45, 46}. El motivo es que el humo del tabaco promueve la citrulinación de proteínas en la matriz extracelular pulmonar, de ahí que actúe de forma sinérgica con el epítipo compartido y PTPN22 para conferir riesgo de AR.

Contaminación ambiental y exposición a sílice: La exposición a cristales de sílice está bien documentada como factor de riesgo ambiental para la AR, habiéndose descrito que podría duplicar el riesgo de padecer AR en análisis ajustado por exposición a tabaco⁴⁷. La contaminación ambiental parece que es la responsable de la diferencia entre la prevalencia de AR en entorno rural y urbano y se ha relacionado con citrulinación de proteínas de la matriz extracelular del pulmón de manera similar a lo descrito con el tabaco^{48, 49, 50}.

Agentes infecciosos: La relación mejor caracterizada entre la AR e infección es con la *Porphyromonas gingivalis* causante de la enfermedad periodontal⁵¹. Esta bacteria dispone de una enzima con actividad peptidil arginil deiminasa o PADI que genera péptidos citrulinados en la matriz extracelular de la mucosa gingival, lo que conduce a que, en individuos portadores del EC, se promueva la formación de ACPA y el desarrollo de la AR^{52, 53}.

Microbiota intestinal: La pérdida de especies comensales protectoras (disbiosis intestinal), podría crear un desequilibrio en la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa que provocaría una predisposición hacia la respuesta inflamatoria. Los enfermos con AR puede que dispongan de un enterotipo distinto, que podría activar o llevar a la autoinmunidad en aquellos con una genética que lo predisponga^{54, 55}.

Factores dietéticos: La obesidad está claramente relacionada con desarrollo de AR, especialmente formas seronegativas⁵⁶. El consumo de ácidos grasos poliinsaturados posee un efecto antiinflamatorio beneficioso para la AR⁵⁷. El aumento del consumo de sal también se ha relacionado con una mayor susceptibilidad a padecer AR, por aumento de las células Th17⁵⁸.

Factores socioeconómicos: El nivel socioeconómico determina el curso de la enfermedad⁵⁹.

2.4. Clínica

La AR es una enfermedad autoinmune sistémica, clínicamente heterogénea, que produce inflamación de las articulaciones diartrodiales, típicamente las pequeñas articulaciones de las manos (metacarpo falángicas e interfalángicas proximales) y de los pies (metatarso falángicas e interfalángicas proximales), respetando característicamente las articulaciones interfalángicas distales. El compromiso articular suele ser simétrico y poliarticular, si bien de forma menos frecuente puede presentarse de forma oligoarticular y asimétrica. Es típico que el dolor y la tumefacción articular se acompañe de rigidez matutina⁶⁰. Frecuentemente el paciente presenta fatiga o astenia asociadas a fiebre vespertina y pérdida de peso.

Las manifestaciones no articulares más frecuentes son los nódulos reumatoides y, con menor frecuencia, pueden aparecer otras manifestaciones extra articulares a nivel ocular, pleurales, pulmonares, cardíacas, piel o riñón.

2.5. Datos de laboratorio

La AR puede producir diversas alteraciones analíticas, típicas de procesos inflamatorios crónicos, como anemia o elevación de reactantes de fase aguda. Pero los datos más característicos serían:

Factor reumatoide (FR): es el autoanticuerpo más clásico y mejor caracterizado de la AR y se trata de una IgM dirigida contra la fracción constante Fc de las IgG2 e IgG3. El FR es positivo aproximadamente en el 75% de los pacientes afectados de AR. Es uno de los criterios diagnósticos de la enfermedad⁶¹, pero no es específico de la misma ya que puede encontrarse en otras enfermedades autoinmunes, infecciones crónicas, procesos inflamatorios e incluso en el 5% de la población sana. A pesar de todo, títulos elevados se asocian con cuadros más graves de la enfermedad articular, con la presencia de nódulos reumatoides y mayor frecuencia de enfermedad extrarticular⁶⁰.

Anticuerpos antipeptidos/proteínas citrulinadas (ACPA): Estos autoanticuerpos están dirigidos contra secuencias peptídicas que han sufrido un proceso de citrulinación, el cual consiste en la conversión del aminoácido arginina en un residuo de citrulina^{62, 63} por la acción de la enzima peptidil arginina-deiminasa, que se activa durante los procesos inflamatorios o de apoptosis⁶⁴. El proceso de citrulinación, por tanto, es un proceso fisiológico que ocurre en las células apoptóticas. Estas células son habitualmente reconocidas y eliminadas por macrófagos y otras células del sistema inmunitario, pero en el contexto de procesos inflamatorios, en los que hay una gran cantidad de muerte celular por necrosis o apoptosis, la eliminación de estas células sería insuficiente, siendo

posible entonces detectar localmente la presencia de proteínas citrulinadas. Esta modificación postranscripcional del aminoácido básico arginina a un residuo neutro como la citrulina, favorece el desarrollo de una respuesta inmunitaria con producción de ACS, siempre en el contexto de una predisposición genética y probablemente también con la intervención de factores ambientales favorecedores. Los ACPA son muy específicos de la AR, hasta un 90%-98%, con una sensibilidad también elevada, de entre el 70% - 80%^{65, 66}. Los ACPA tienen, por tanto, una sensibilidad similar al FR pero una mayor especificidad⁶⁷ y, al igual que el FR, tienen también valor pronóstico⁶⁸.

Anticuerpos antinucleares: se detectan en un 10-25% de los pacientes, sobre todo en los que tienen FR o los que padecen síndrome de Sjögren secundario. Se asocian con peor pronóstico⁶⁰.

Líquido sinovial: aporta escasa información específica y, por lo común, sirve para establecer el diagnóstico diferencial con otras artritis, especialmente en la artropatía por depósito de cristales de pirofosfato cálcico.

2.6. Datos radiológicos

2.6.1. Radiología

La inflamación articular prolongada de las articulaciones afectadas en la AR provoca: a) la destrucción del cartílago articular y el hueso subyacente, b) hipertrofia sinovial, y c) derrame articular. Estas alteraciones se manifiestan radiológicamente como aumento de densidad de las partes blandas peri articulares, disminución del espacio entre ambos extremos óseos de la articulación, osteoporosis yuxtarticular y, cuando la enfermedad avanza, presencia de erosiones óseas marginales de la superficie articular y geodas intraóseas.

2.6.2. Ecografía y Resonancia magnética nuclear

Son técnicas más sensibles para la detección de sinovitis que la radiografía convencional y se ha demostrado una mayor sensibilidad que la radiología convencional para detección precoz de erosiones⁶⁹.

2.7. Criterios de clasificación

Aunque el diagnóstico de AR es eminentemente clínico, a lo largo de los años se han establecido criterios de clasificación de la enfermedad con el fin de hacer estudios con grupos de población más

homogéneos. En la actualidad, los dos paquetes de criterios de clasificación más utilizados son los del ACR de 1.987⁶¹ y los del consenso ACR/EULAR de 2.010⁷¹.

Tabla 2: Criterios revisados de la ACR de 1.987⁶¹.

Criterios revisados de la (ACR de 1.987):	
1	Rigidez matutina en o alrededor de las articulaciones, de cómo mínimo una hora de duración hasta la máxima mejoría.
2	Artritis de tres o más articulaciones. Como mínimo tres áreas de las siguientes (de 14 posibles: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos, metatarsofalángicas) presentan artritis simultáneamente (revisadas por un médico).
3	Artritis de las manos. Al menos una de las seis áreas definidas en el punto anterior es en muñeca, metacarpofalángicas o interfalángicas proximales.
4	Artritis simétrica. Afectación simultánea de la misma articulación en los dos lados del cuerpo (artritis bilateral de interfalángicas proximales, metacarpofalángicas o metatarsofalángicas, aunque una simetría no absoluta es aceptable).
5	Nódulos reumatoides. Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas o en superficies extensoras, o en regiones yuxtaarticulares observadas por un médico.
6	Positividad del factor reumatoide. Demostración de niveles anormales de FR por cualquier método que sea positivo en menos del 5% de los controles sanos.
7	Cambios radiográficos. Alteraciones radiográficas típicas de AR en radiografía posteroanterior de mano o muñeca, que deben incluir erosiones u osteoporosis yuxtaarticulares en o al lado de las articulaciones afectas (los cambios artrósicos solos no cuentan).

Se catalogará de AR si el paciente cumple como mínimo cuatro de estos criterios y los criterios clínicos han de permanecer presentes como mínimo seis semanas. Dado que está sólidamente demostrado que el inicio de tratamiento en las fases muy precoces de la enfermedad, la llamada ventana de oportunidad de unas 14-16 semanas desde el inicio de la inflamación⁶⁹, mejora la respuesta al tratamiento, en septiembre de 2.010 se publicaron simultáneamente en *Annals of Rheumatic Diseases*⁷¹ y *Arthritis and Rheumatism*⁷² los nuevos criterios de clasificación para la AR, como resultado del esfuerzo conjunto realizado por la EULAR y el ACR. El objetivo era mejorar la clasificación de la AR de corta evolución, de manera que se pueda establecer un tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad (FAME) lo antes posible. Los nuevos criterios de AR sólo se aplicarán a personas que presentan al menos una articulación con sinovitis clínica y que dicha sinovitis no pueda explicarse por el padecimiento de otra enfermedad. Un paciente será clasificado de AR si la suma total según la tabla 3 es igual o superior a 6.

Estos criterios también permiten hacer el diagnóstico de los pacientes que presenten una AR evolucionada si cumplen: a) presencia de erosiones típicas de AR, b) enfermedad de larga evolución, bien sea activa o inactiva y cuyos datos retrospectivos permitan la clasificación con los criterios del 2.010 y c) en las artritis de muy reciente comienzo, en individuos que no cumplan en un momento dado los criterios pero que los cumplan con la evolución del tiempo⁷².

Tabla 3: Conjunto de variables y puntuación de cada una de las variables para el cómputo global⁷².

Afección articular	puntuación
1 articulación grande afectada	0
2 – 10 articulaciones grandes afectadas	1
1 – 3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4 – 10 articulaciones pequeñas afectadas	3
Más de 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
Serología	puntuación
FR y ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivos bajos (< 3 VN)	2
FR y/o ACPA positivos alto (> 3 VN)	3
Reactantes fase aguda	puntuación
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
Duración	puntuación
< De seis semanas	0
≥ A seis semanas	1

Abreviaturas: ACPA: anticuerpos contra péptidos citrulinados; FR: factor reumatoide; PCR: proteína C reactiva; VN: valor normal; VSG: velocidad de sedimentación globular.

3. INMUNIDAD ADAPTATIVA Y ARTRITIS REUMATOIDE

En la fase preclínica de la enfermedad ocurre la pérdida de la tolerancia frente a antígenos propios. Se acepta que es consecuencia de la interacción de factores genéticos y ambientales y que comienza años antes de que los pacientes presenten síntomas. Esta fase se conoce por la demostración de la presencia de autoanticuerpos específicos (ACPA, FR o anticuerpos antiproteínas carbamiladas) en el suero de las personas que más tarde desarrollarán AR.

La especificidad de los autoanticuerpos en la AR es debida a modificaciones postraduccionales como la citrulinación y la carbamilación. Hoy en día se acepta que la rotura de la tolerancia inmunitaria a determinados ag como los péptidos citrulinados ocurre en mucosas como la pulmonar⁷³ o la gingival^{74, 75} y que la respuesta autoinmune se produce en ganglios linfáticos que drenan dichas localizaciones. Sin embargo, la causa y los mecanismos por los que finalmente la fase efectora de la inmunidad adaptativa se produce en las articulaciones diartrodiales no están claros.

En la fase de artritis establecida, la membrana sinovial de los pacientes con AR se transforma en un tejido denominado pannus caracterizado por una hiperplasia de la capa íntima (tanto sinoviocitos A como B) y un infiltrado inflamatorio subintimal formado por linfocitos T y B, macrófagos, células NK

y mastocitos. Todas las células presentes muestran datos de activación y principalmente los macrófagos y los sinoviocitos producen citocinas inflamatorias y quimiocinas que atraen a más leucocitos. Este microambiente tisular lleva a la diferenciación de los monocitos sanguíneos en osteoclastos^{76, 77, 78, 79, 80} y a la secreción de metaloproteasas. Todo ello produce destrucción del cartílago y del hueso, pinzamiento articular y erosiones óseas.

3.1. Linfocitos T en AR

Posteriormente al contacto con ag inicial, para que los LT de memoria efectores produzcan sus citoquinas características de forma eficiente, tienen que volver a reconocer el antígeno para el que son específicas. En la AR, este proceso es factible en el caso de LT reactivos a proteínas citrulinadas ya que en la matriz extracelular de la membrana sinovial hay abundantes proteínas con estas modificaciones postraduccionales. Sin embargo, la mayoría de los LT CD4+ de memoria efectora que infiltran la membrana sinovial no reconocen proteínas citrulinadas, simplemente han migrado a la membrana sinovial gracias a su expresión de moléculas de adhesión y a la quimiotaxis producida por las quimioquinas que les atraen al foco inflamatorio. Estos LT no específicos pueden también participar en la perpetuación de la respuesta inmune ya que se ha descrito que las citoquinas presentes en la membrana sinovial de la AR pueden activar “in vitro” a los LT de memoria, que son capaces de estimular por contactos intercelulares a los macrófagos para producir más TNF α e IL-6 en un circuito de perpetuación de la respuesta inflamatoria.

Los LT también producen citocinas que median la activación de monocitos, macrófagos y fibroblastos, induciendo factores de destrucción de hueso y cartílago. Además, los LT efectores, pueden inducir la diferenciación a osteoclastos por contacto directo⁷⁷.

En cuanto a la proporción de los distintos linfocitos T en AR, los LT de memoria constituyen más del 50% de las células de la membrana sinovial, siendo la mayoría linfocitos CD4+ que se disponen de forma difusa o formando agregados con los linfocitos B. En esta agrupación también se encuentran, aunque en menor proporción, LT CD8+⁷⁸.

Entre los linfocitos CD4+ existe un predominio de células Th1 y Th17 respecto a células Th2 y células T reguladoras. Las células Th1 y Th17 clásicamente se las ha considerado responsables de la patogénesis de determinadas enfermedades autoinmunes como la AR, esclerosis múltiple, psoriasis y enfermedad inflamatoria intestinal¹². Varias investigaciones hasta la fecha han descrito un aumento de los LTh17 en SP de pacientes con AR^{81, 82}.

Por otro lado, es importante destacar la implicación de otras poblaciones de LT relevantes en AR como los LT reguladores y los LT foliculares. Los LT reguladores están especializados en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio y su alteración favorece la generación de eventos autoinmunes. Los datos sobre la frecuencia de LT reguladores en SP de pacientes con AR son controvertidos y varían a lo largo de la literatura, en la cual se describe como disminuido⁸³⁻⁸⁷, similar⁸⁸ y aumentado^{89, 90} en comparación con controles sanos. Con respecto a los LT foliculares, su importancia en la AR radica en su implicación en el cambio de clase de Igs necesaria para la generación de autoanticuerpos por parte de los LB autoreactivos productores de ACPA y cuyo aumento en SP se relaciona con un aumento de ACPA⁹¹⁻⁹⁵. Sin embargo, esta interacción T-dependiente no es necesaria para la generación de FR por parte de los LB.

3.2. Linfocitos B en AR

La presencia del FR como un marcador de AR apuntó desde hace décadas a los LB como células muy relevantes en la patogenia de la AR. Posteriormente, diferentes hallazgos señalaron a los LT y macrófagos como células importantes en la patogenia de la enfermedad y clásicamente se la ha considerado una patología mediada por hipersensibilidad de tipo IV. En los últimos 15 años, el éxito de la terapia de eliminación de los LB puso de nuevo de manifiesto la importancia de estas células en la patogenia de la AR. Son varias las funciones que se atribuyen a los linfocitos B en la patogenia de la AR: la producción de autoanticuerpos, como el FR⁹⁶ o los ACPA, con distintas funciones patogénicas como la estimulación de la osteoclastogénesis⁹⁷, la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α ⁹⁷, BAFF-BLyS (B cell activating factor belonging to the TNF family B-lymphocyte stimulator) y APRIL (A proliferation-inducing ligand)⁷⁸ y la organización junto con los LT de estructuras similares a los OLS, los denominados órganos linfoides terciarios o ectópicos. En ellos se pueden distinguir subpoblaciones diferentes de linfocitos B, como células plasmáticas alrededor de los folículos, linfocitos B CD20+ maduros que están en interacción con las células T CD4+ y linfocitos B activados que tienen fenotipo de células B de CG⁹⁸. Los centros germinales ectópicos que se forman en la AR se asocian a una mayor producción de FR y a-CCP, aunque no están relacionados con una mayor actividad clínica⁹⁹.

En cuanto a la proporción de las diferentes subpoblaciones de LB en SP en pacientes con AR, es llamativo que los pacientes con AR no poseen diferentes porcentajes de LB transicionales, naïve y de memoria, aunque en estos pacientes sí que se evidencia un mayor número de LB activados¹⁰⁰.

Otras subpoblaciones de LB con potencial patogénico en la AR son los linfocitos B CD21low y los CCR6+ ya que se ha descrito su aumento en pacientes con dicha enfermedad^{101, 102}. Los linfocitos B

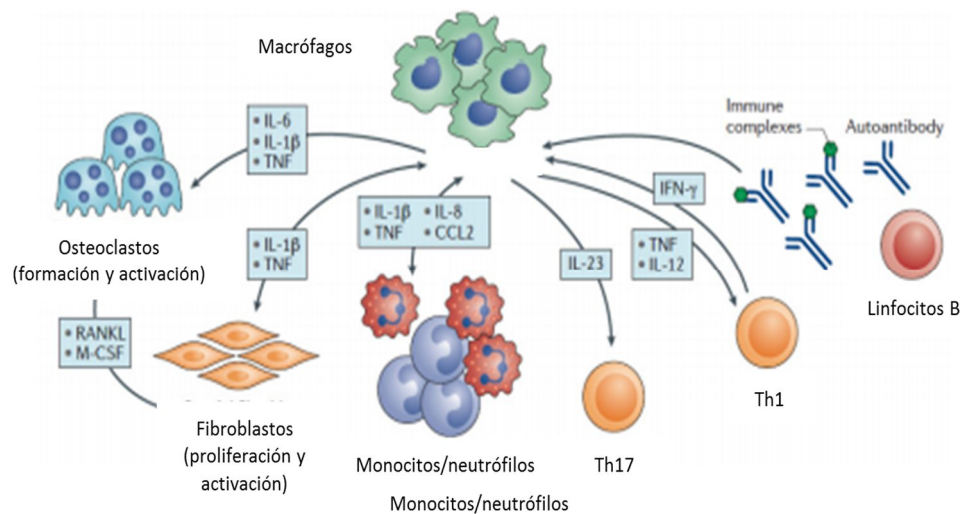
CD21^{low} han sido identificados como LB con gran capacidad para actuar como CPA¹⁰¹ y la expresión del receptor CCR6 en LB es necesaria para la su localización en el centro germinal¹⁰².

3.3. Mediadores solubles implicados en AR

Las citocinas desempeñan un papel fundamental en la inflamación, la destrucción articular y las manifestación extraarticulares que se asocian a la AR^{103, 104}. En concreto, el aumento de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa, las interleucinas IL -1, IL-6 e IL-17, promueven y perpetúan la inflamación crónica y los efectos que de ella derivan en esta patología. Dichas citocinas se sintetizan en los sinoviocitos y otras células del pannus de la sinovia, favoreciendo la inflamación y pudiendo afectar directamente al hueso¹⁰⁵.

La tabla 7 muestra algunas de las citocinas más relevantes en AR, sobre todo por su relación con la expresión de otras citocinas proinflamatorias y por su impacto en los LT.

Figura 3: Citoquinas producidas en la sinovial reumatoide.



Abreviaturas: TNF: factor de necrosis tumoral; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear κB; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; IFNγ: interferón gamma. Adaptada de: Udalova IA, et al. *Nat Rev Rheumatol* 12 (8):472-485

Tabla 4: citocinas relevantes en artritis reumatoide¹⁰⁶⁻¹¹⁴.

TNFα	Interviene en la inflamación, apoptosis. Es la citoquina principal en el desarrollo y mantenimiento de los mecanismos efectores en la membrana sinovial de la mayoría de los pacientes con AR. Proporciona un estímulo importante para las células productoras de mediadores inflamatorios (citocinas, óxido nítrico, prostaglandina E2, etc.)
IL-1	Se presenta en dos formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β . El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-1 β , están implicadas en la perpetuación de la inflamación crónica en la AR. Media la destrucción de cartílago y hueso a través de la secreción de metaloproteinasas.
IFN-γ	Induce la expresión de HLA-DR en células presentadoras de antígeno y activa macrófagos. Aumenta las moléculas de adhesión en el endotelio.
IL-2	Acción proinflamatorias. Es un factor de crecimiento autocrino de los linfocitos T.
IL-6	Induce la síntesis de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B, participa en la diferenciación a linfocitos T citotóxicos e induce la producción de reactantes de fase aguda.
IL-12	Promueve la respuesta inmune celular, induce la secreción de IFN- γ , estimula la proliferación de linfocitos T, estimula la citotoxicidad de las células NK y favorece la diferenciación a Th1.
IL-15	Es esencial para la supervivencia de los linfocitos T de memoria. Produce quimiotaxis y proliferación de células T y aumenta la producción de Igs en los linfocitos B además de facilitar el "switch" de Igs. Aumenta la producción de IL-17. En modelos animales, su aumento se correlaciona con un aumento de la actividad. [17mix] [19mix]
IL-17	Activa los sinoviocitos para producir IL-6, IL-8, GM-CSF y, uno de los principales mediadores de la inflamación, la PGE. Es producida por los linfocitos Th17. Activador de osteoclastogénesis
IL-18	Induce la secreción de IFN- γ , estimulando indirectamente a células NKs y linfocitos T. favorece angiogénesis.
IL-23	Estimula la producción de IL-1 β y TNF- α , promueve la expansión y supervivencia de Th17 y la defensa del huésped frente a patógenos.

4. RITUXIMAB Y ARTRITIS REUMATOIDE

4.1. Rituximab

Rituximab (RTX) es un anticuerpo monoclonal terapéutico, quimérico humano-murino, que reconoce la molécula CD20 humana. Estructuralmente consta de una cadena pesada IgG1 humana, una región constante de la cadena ligera kappa humana y secuencias de la región variable murina específicas para la unión a CD20 humano. La subclase IgG1 se suele emplear en los anticuerpos terapéuticos por su capacidad para fijar el complemento y para mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, que junto con la inducción de apoptosis, son los principales mecanismos de acción de RTX¹¹⁵⁻¹¹⁸.

CD20 es una diana efectiva de anticuerpos monoclonales ya que se expresa con niveles altos en la membrana celular de los LB y no se internaliza después de unirse con el anticuerpo monoclonal.

El ag de superficie CD20 es una fosfoproteína de membrana plasmática, de función desconocida, aunque se cree que está involucrada en la activación y la regulación del crecimiento de las células B y el flujo de calcio transmembrana. Se expresa en los linfocitos B desde el estadio pre-B hasta el de linfocito B maduro de memoria, pero no se expresa ni en los linfocitos pro-B, ni en las células plasmáticas, por lo que el tratamiento con RTX permite la repoblación de linfocitos B, en principio con menos clones autoreactivos, y la producción de anticuerpos por las células plasmáticas¹¹⁹. De

esta manera, el tratamiento cíclico con RTX no compromete de forma muy importante la inmunidad humoral.

Rituximab fue desarrollado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin de células B, indicación que fue aprobada en el año 1997. Posteriormente, ante el hallazgo de mejoría de la artritis en pacientes con AR que habían sido tratados con RTX por padecer un linfoma, Roche desarrolló una línea de investigación que culminó en el año 2006 con la aprobación por parte de la FDA para el tratamiento de pacientes con AR no respondedores a antagonistas del TNF¹²⁰⁻¹²². Sin embargo, el mecanismo de acción exacto por el que RTX es efectivo en la AR no está totalmente caracterizado, ya que, aunque la eliminación de linfocitos CD20 positivos es prácticamente inmediata, el efecto clínico de mejoría de la artritis puede llegar a tardar 2 a 4 meses.

4.2. Pauta de tratamiento de Rituximab en AR

La pauta indicada en la ficha técnica para el tratamiento de la AR es de 2 infusiones de 1000 mg, separadas por un intervalo de 2 semanas que puede ser repetida cada 6 meses. Sin embargo, en la práctica clínica diaria se suelen utilizar otras pautas de tratamiento, principalmente el uso de ciclos de 1 gramo y el uso a demanda cuando la enfermedad comienza a reactivarse^{123, 124}.

La vida media del RTX es de 20 días, aunque se pueden detectar niveles de RTX hasta 6 meses después de la administración. La eliminación de linfocitos B es máxima a las 2 semanas de la última infusión y la repoblación, aunque es variable, se produce entre los 6 y 12 meses después del tratamiento^{125, 126, 127}.

El tratamiento con Rituximab intravenoso en los pacientes con AR produce una eliminación casi completa de las células B de sangre periférica y una eliminación variable de las células B de la membrana sinovial y de otras localizaciones, como los órganos linfoides secundarios y la médula ósea^{115, 128}.

4.3. Efectos de Rituximab en el sistema inmunitario de pacientes con AR

Se han propuesto distintas hipótesis para explicar el efecto benéfico de la eliminación de los linfocitos B en la AR incluyendo la eliminación de linfocitos B autoreactivos, la disminución de la función presentadora de Ag de los linfocitos B y la falta de una cooperación T-B adecuada, entre otros.

Sin embargo, se desconocen los efectos concretos de este anticuerpo sobre las distintas subpoblaciones de linfocitos B y T tras su empleo en uno o varios ciclos de tratamiento. Tampoco se ha caracterizado en detalle la asociación entre los valores en sangre periférica de determinadas subpoblaciones de linfocitos B y T con la actividad clínica de la enfermedad.

Hasta la fecha los estudios realizados muestran en torno a un 95% de éxito en la eliminación de LB a los 3 meses desde la infusión, con una media de 8-10 meses para la reaparición de los mismos en SP^{129, 130, 131}. Aunque en números de pacientes muy restringidos, los estudios previos coinciden en que la aparición de LB en SP sigue un patrón característico que coincide con la ontogenia normal de los LB¹²⁹⁻¹³². Desde el punto de vista clínico en un 50-60% de los pacientes se reactiva la enfermedad cuando reaparecen los linfocitos B en sangre periférica (patrón concordante), aunque en algunos pacientes la mejoría clínica puede persistir meses después (patrón discordante)¹¹⁹. Dado que este patrón suele ser característico de cada paciente en los ciclos sucesivos, sería interesante determinar si alguna población de células B como podrían ser los linfocitos B CD21low o los LB con expresión de CCR6, pueden ayudar a predecir el tipo de patrón o la duración de la respuesta.

Por otro lado, son escasos los estudios que hoy en día se han realizado para ver el impacto de la eliminación de LB en las diferentes subpoblaciones de LT, además las subpoblaciones estudiadas se limitan a LT naïve y de memoria, por lo que no se conoce el impacto de RTX en linfocitos implicados en AR como los linfocitos Th17, Th22, LT reguladores y Th foliculares. Actualmente no existe evidencia firme de la modulación de los LT tras la eliminación transitoria de LB por RTX, encontrándose datos contradictorios en las investigaciones realizadas hasta la fecha.

Estos últimos aspectos se abordan en la presente tesis con la finalidad de caracterizar mejor los mecanismos de acción de RTX en la AR.

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

La artritis reumatoide es una enfermedad con una etiología y patogenia heterogéneas. Aunque en la actualidad se considera que se trata de una enfermedad mediada por linfocitos T, otras células del sistema inmune participan en una compleja red de interacciones que contribuyen a la perpetuación de la inflamación en las articulaciones. Desde hace más de 10 años sabemos que la depleción de linfocitos B con RTX induce mejorías transitorias de la inflamación en los pacientes con AR, especialmente aquellos que presentan autoanticuerpos como el factor reumatoide o los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas. Es probable que la depleción transitoria de linfocitos B provoque cambios en otras subpoblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune, cuya consecuencia sea la atenuación del proceso inflamatorio.

1. Hipótesis de trabajo

El tratamiento con RTX en pacientes con AR induce la modificación de subpoblaciones de la inmunidad adaptativa, relevantes en la perpetuación de la sinovitis crónica.

2. Objetivo

- 2.1. Analizar si los sucesivos ciclos de tratamiento con RTX provocan efectos acumulativos en las diferentes subpoblaciones linfocitarias B y T.
- 2.2. Estudiar el patrón de repoblación de las subpoblaciones B tras el tratamiento con RTX.
- 2.3. Estudiar el efecto de la depleción de linfocitos B con RTX sobre las subpoblaciones de linfocitos T.
- 2.4. Relación entre la actividad de la AR y las distintas subpoblaciones de linfocitos B y T.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes

Los pacientes incluidos en el estudio descrito en esta tesis doctoral son un subconjunto seleccionado de los pacientes del estudio denominado RITAR (RITuximab en Artritis Reumatoide). RITAR es un estudio observacional retrospectivo, abierto, que describe los patrones de uso de RTX en un hospital terciario de Madrid (Hospital Universitario La Princesa) del 2005 al 2014, y un período de seguimiento que abarca hasta diciembre de 2015.

En RITAR se incluyeron 114 pacientes clasificados como AR según los criterios de ACR de 1987⁶¹ que fueron tratados con al menos un ciclo de RTX. Los pacientes se identificaron a partir de la base de datos del Departamento de Farmacia del Hospital y se revisaron los cuadros clínicos para confirmar el diagnóstico de AR con los criterios de ACR 1987. Los pacientes que no cumplieron con los criterios, aquellos con antecedentes de otra enfermedad autoinmune o pacientes con AR en los que se prescribió RTX debido a complicaciones sistémicas se excluyeron del estudio. También se excluyeron los ciclos de RTX que se perdieron durante el seguimiento y los ciclos administrados bajo un protocolo de ensayo clínico.

Para la caracterización de los pacientes del estudio RITAR se registraron las características iniciales de los pacientes, incluidos los datos demográficos (sexo, edad al inicio de la enfermedad, edad al inicio de RTX), presencia de comorbilidades (osteoporosis, hipertensión, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, enfermedad cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad gástrica, úlcera, depresión, neoplasias sólidas o hematológicas) y complicaciones de la AR (luxación atlantoaxial, vasculitis reumatoide, enfermedad pulmonar, episcleritis, serositis, síndrome de Sjögren, amiloidosis, síndrome de Felty) (tablas 5, 6, 7).

Como puede observarse en la tabla 1, los pacientes comenzaron con el tratamiento con RTX a una mediana de edad de 60 años (Rango intercuartílico [RIC]: 51-69) y la mediana de la duración de la enfermedad fue de 11 años (RIC: 6-16). La mayoría de los pacientes sufrían de enfermedad seropositiva (93%) y el 80,7% de ellas eran mujeres. Dado que, después de la aprobación de RTX, se aprobaron nuevas terapias biológicas para el tratamiento de la AR, para la realización del estudio RITAR los pacientes se dividieron en tres grupos considerando el año de inicio de RTX (antes de 2009, 2009-11 y 2012-14) ya que en los primeros años había menos alternativas terapéuticas. Como se muestra en la Tabla 1, antes de 2009 los pacientes tratados con RTX eran más jóvenes y los casos seronegativos se trataban con más frecuencia. Además, aquellos tratados después de 2012 sufrieron menos comorbilidades ($p=0.018$) y complicaciones sistémicas ($p=0.119$). No se observaron diferencias en términos de FAME anteriores, terapias biológicas o actividad de la enfermedad al inicio del tratamiento.

Tabla 5: Características de los pacientes del estudio RITAR.

	Año de comienzo con RTX			P	Número de ciclos con RTX		P	Total n=114
	≤ 2008 (n=49)	2009- 2011 (n=38)	2012- 2014 (n=27)		n≤2 (n=46)	n≥3 (n=68)		
Femenino, n (%)	38 (77.6%)	31 (81.6%)	23 (85.2%)	0.720	37 (80.4%)	55 (80.8)	1.000	92 (80,7%)
Años de inicio; (años; p50 [RIC])	41 (38-53)	54 (42-63)	54 (42-57)	0.012	54 (41-62)	46 (39-56)	0.041	50 (40-59)
Edad comienzo RTX (años; p50 [RIC])	56 (47-64)	64 (55-74)	60 (54-67)	0.061	64 (52-70)	58 (49-66)	0.096	60 (51-69)
Complicaciones n (%)				0.119			0.431	
0	29 (59.1%)	19 (50.0%)	20 (74.1%)		30 (65.2%)	38 (55.9%)		68 (59,7%)
1-2	19 (38.8%)	19 (50.0%)	6 (22.2%)		16 (34.8%)	28 (41.2%)		44 (38,6%)
> 2	1 (2.1%)	0 (0.0%)	1 (3.7%)		0 (0.0%)	2 (2.9%)		2 (1,75%)
Comorbilidades n (%)				0.012			0.829	
0-1	36 (73.5%)	23 (60.5%)	25 (93.6%)		33 (71.4%)	51 (75.0%)		84 (73,7%)
≥ 2	13 (26.5%)	15 (39.5%)	2 (7.4%)		13 (28.3%)	17 (25.0%)		30 (26,3%)
RF y/o ACPA + (%)	43 (87.8%)	38 (100%)	25 (93.6%)	0.065	41 (89.1%)	65 (95.6%)	0.265	106 (92,8%)
FAMEs previos (p50 [RIC])	2 (1-3)	2 (1-3)	2 (1-3)	0.287	2 (1-3)	2 (1-3)	0.754	2 (1-3)
TB previo (p50 [RIC])	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	0.654	2 (1-2)	1 (1-2)	0.692	1 (1-2)
RTX primera línea n (%)	10 (20,4%)	9 (23,7%)	3 (11,1%)	0,289	7 (15,2%)	15 (22,1%)	0,066	22 (19,3%)
DAS28 al ciclo 1 (p50 [RIC])	5.3 (4.8-6.0)	5.4 (4.7-6.0)	5.3 (4.6-5.2)	0.576	5.1 (4.6-5.9)	5.4 (4.8-6.0)	0.228	5,3 (4,7-5,9)
HAQ al ciclo 1 (p50 [RIC])	1.5 (0.8-1.6)	1.3 (0.8-1.8)	1.1 (0.8-1.8)	0.940	1 (0.6-1.6)	1.6 (0.8-1.8)	0.355	1 (0,5-1,6)

Abreviaturas: n: número; IQR: rango intercuartílico; FR: factor reumatoide; ACPA: anticuerpos antiproteínas citrulinadas; p50: percentil 50 o mediana; RIC: rango intercuartílico; AR: artritis reumatoide; FAMEs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; TB: terapia biológica; DAS28: (siglas en inglés) “disease activity score based on a 28-joint count”; HAQ: Cuestionario de Evaluación de la Salud.

Tabla 6: Complicaciones asociadas a la artritis reumatoide

	N (%)
Subluxación atlantoaxoidea	17 (14,9%)
Vasculitis Reumatoide	0 (0%)
Serositis	1 (0.9%)
Enfermedad pulmonar intersticial	9 (7,9%)
Epiescleritis	0 (0%)
Síndrome de Sjögren	36 (31,6%)
Amiloidosis	3 (2,6%)
Síndrome de Felty	0 (0%)
Total	47 (41,2%)

Tabla 7: Comorbilidades.

	N (%)
Hipertensión	34 (29.8%)
Diabetes mellitus	16 (14.0%)
Hipercolesterolemia	32 (28.1%)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	10 (8.8%)
Úlcera gástrica	5 (4.4%)
Depresión	11 (9.7%)
Cardiopatía isquémica	8 (7.0%)
Accidente cerebrovascular	7 (6.1%)
Insuficiencia cardíaca congestiva	2 (1.7%)
Osteoporosis	35 (31.0%)
Neoplasia sólida	15 (13.2%)
Neoplasia hematológica	6 (5.3%)
Total	76 (66.7%)

El 41,2% de los pacientes desarrollaron alguna complicación asociada a la AR, siendo el síndrome de Sjögren la complicación que sufrió un mayor número de pacientes (31,6%), seguida de la subluxación atlantoaxial (tabla 6).

Un 66,7% de los pacientes presentaron comorbilidades tales como osteoporosis que se presentó en el 31% de los pacientes, hipertensión en el 29,8%, hipercolesterolemia en el 28.1% o la aparición de neoplasias sólidas en el 13,2% de ellos (tabla 7).

Para el estudio del inmunofenotipo (IF) de linfocitos de SP se incluyeron 69 pacientes clasificados como AR según los criterios de ACR de 1987⁶¹ que fueron tratados con RTX desde agosto de 2010 a junio de 2013 y cumplieron los criterios de inclusión y exclusión. Como se describe en la sección de resultados, son un subconjunto representativo al no encontrarse diferencias significativas en las características estudiadas, entre los pacientes del estudio RITAR y los del estudio del IF.

2. Ciclos de tratamiento con RTX

En el estudio RITAR se analizaron un total de 409 ciclos de tratamiento con RTX realizados a los 114 pacientes descritos en el apartado anterior. Para el estudio del IF de subpoblaciones linfocitarias, los 69 pacientes contribuyeron con un total de 114 ciclos de tratamiento con RTX.

Para realizar las comparaciones oportunas, los ciclos de tratamiento se dividieron en dos subconjuntos. Un grupo incluía los primeros ciclos de tratamiento con RTX, los cuales se denominarán a partir de ahora como ciclos naïve, y está compuesto por 29 ciclos de tratamiento. Los ciclos de RTX restantes (85 ciclos) correspondieron a los ciclos del 2° al 9° y se denominarán ciclos sucesivos. Algunos pacientes contribuyeron con más de un ciclo al estudio, de los cuales 9 pacientes contribuyeron con su primer y segundo ciclo, y algunos otros pacientes contribuyeron hasta con 4 ciclos. En el apartado de estadísticas, de esta misma sección, se proporciona información sobre cómo se consideró esta circunstancia para evitar el sesgo debido a la sobrerrepresentación de estos casos, así como si hubo un efecto aditivo del tratamiento de RTX o se podía considerar los pacientes con sucesivos ciclos como un grupo homogéneo.

3. Criterios de elegibilidad y exclusión

Además de los criterios empleados para el estudio RITAR, en el estudio de IF de subpoblaciones linfocitarias, se excluyeron los pacientes que se volvieron a tratar con RTX en un periodo fijo de 6 meses y los que fueron tratados de nuevo a pesar de la falta de repoblación de la celularidad B.

Para el estudio del IF de subpoblaciones linfocitarias B y T, solo se incluyeron pacientes tratados "a demanda" cuando la enfermedad reaparece. Por lo tanto, ninguno de los pacientes estudiados en este trabajo recibió RTX en un periodo fijo, es decir cada 6 meses, ya que la pauta fija no permite estudiar cómo se produce la repoblación de los linfocitos B. Además, en 14 ciclos sucesivos adicionales, los pacientes se volvieron a tratar con RTX a pesar de que no se había producido la repoblación las células B en SP. Estos ciclos también fueron excluidos del análisis.

4. Datos recogidos

Como datos sociodemográficos se recogieron la edad, el sexo, nivel de estudios y tipo de trabajo. Como datos de la enfermedad se registró la edad de inicio y la edad de comienzo del tratamiento con RTX, los datos de FR y ACPA, el número de complicaciones y comorbilidades. Sobre el tratamiento se registraron los tratamientos previos (FAMES o terapia biológica) y el uso o no de tratamiento concomitante con el tratamiento de RTX, así como la dosis y pautas del tratamiento con RTX y la utilización o no de RTX como primera línea de tratamiento. Como datos clínicos se obtuvieron el tiempo de duración de la rigidez matutina (RM), el número de articulaciones dolorosas (NAD), el número de articulaciones tumefactas (NAT), la valoración global por parte del paciente (VGP) y la valoración de la enfermedad del médico. Para valorar la actividad de la enfermedad de los pacientes, se recogieron los datos de DAS28 y la velocidad de sedimentación globular (VSG) (tabla 8).

El DAS28 es una medida de la actividad de la enfermedad en la AR. DAS son las siglas de Disease Activity Score (Puntuación de actividad de la enfermedad) y el número 28 se refiere a las 28 articulaciones que se examinan en esta evaluación; y se calcula mediante la fórmula:

$$DAS28 = 0,56 \times \sqrt{NAD(28)} + 0,28 \times \sqrt{NAT(NAD)} + \ln(VSG) + 0,014 \times VGP$$

La VSG se expresa en mm/h y la VGP en escala de 0 a 100. El recuento de NAD y NAT es sobre 28 articulaciones, en concreto: hombros, codos, carpos, metacarpofalángicas, interfalángicas proximales y rodillas.

También se recogieron datos de capacidad funcional de los pacientes mediante la versión validada en castellano del cuestionario Health Assessment Questionnaire (HAQ)¹³³.

El HAQ es un cuestionario de 20 ítems que evalúa la discapacidad física percibida por el paciente para realizar diversas actividades básicas de la vida diaria.

Tablas 8: Datos recogidos para la caracterización de los pacientes.

Datos recogidos
sexo
Años de inicio de la enfermedad
Edad de comienzo del tratamiento con RTX
Número de complicaciones de la AR al inicio del ciclo
Número de comorbilidades presentes al inicio del ciclo
Porcentaje de pacientes con FR y/o ACPA positivo
Tratamiento previo con FAMEs
Tratamiento biológico previo
Monoterapia con RTX
DAS28 al inicio del ciclo
HAQ al inicio del ciclo
VSG al inicio del ciclo
Número de articulaciones dolorosas al inicio del ciclo
Número de articulaciones tumefactas al inicio del ciclo
Valoración global de la enfermedad por el paciente al inicio del ciclo
Valoración de la enfermedad del médico al inicio del ciclo
Rigidez matutina al inicio del ciclo

Abreviaturas: ACPA: anticuerpos anti proteínas citrulinadas; DAS28: Disease Activity Score en28 articulaciones; FAMEs: fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad; FR: factor reumatoide; HAQ: Health Assessment Questionnaire; RTX: rituximab; VSG: velocidad de sedimentación globular.

5. Tratamiento

El estudio RITAR registró los datos de FAMEs concomitantes, datos de FAME no biológicos y terapias biológicas anteriores, incluidos el número de líneas biológicas, las fechas de inicio y retirada, así como el motivo de la interrupción (falta o pérdida de efectividad, reacciones adversas y otros) (tablas 9 y 10).

Como se muestra en la Tabla 5, RTX se usó principalmente como terapia biológica de segunda línea. Sin embargo, RTX fue el primer tratamiento biológico en 19.3% de los casos en general, siendo menos frecuente desde 2012: 20.4% antes de 2009, 23.7% en 2009-2011 y 11.1% en 2012-2014 ($p = 0.267$). La mediana del número de ciclos de RTX por paciente fue de 3 (RIC: 2-6), con un rango de 1 a 11.

El programa de retratamiento “a demanda” se utilizó en el 94,6% del total de los ciclos de RTX frente al retratamiento fijo cada 6 meses en el 5,4%. El retratamiento fijo con RTX fue más frecuente

durante los primeros años de uso de RTX en nuestro centro, pero este patrón de uso desapareció desde 2012. Además, cuando se usó, el programa de retratamiento fijo fue más común en los cursos iniciales de tratamiento. Este patrón de uso alcanzó 12.5% en el primer ciclo, 6.9% en el segundo, 3.3% en el tercero y 2.0% en el cuarto y luego, para aquellos pacientes que recibieron cinco o más ciclos, siempre se utilizó el programa bajo demanda.

La dosis de RTX de 1 x 1000 mg se usó en el 31,8% de los ciclos totales. Específicamente, en el 91,5% de los primeros ciclos de RTX, la dosis utilizada fue de 2000 mg. El uso de RTX a una dosis de 1000 mg por ciclo aumentó gradualmente hasta el 80-100% en aquellos pacientes con más de 6 ciclos.

La tabla 9 muestra el tratamiento concomitante de FAME en los ciclos administrados a la población de RITAR. Para el estudio del IF de subpoblaciones linfocitarias, los pacientes incluidos se encuentran entre los periodos de 2010 a 2013 de forma que aproximadamente en un 20% se utilizó RTX sin FAME concomitante. En cuanto a los FAMEs utilizados con RTX, el más frecuente fue el metotrexato, usado en aproximadamente el 55%, seguido de leflunomida alrededor de un 35%, hidroxicloroquina entre un 3 y un 5%, sulfasalazina en aproximadamente un 5% y otros como azatioprina y ciclosporina que se usaron junto con RTX en un 2% de los pacientes. En alrededor de un 15% de los ciclos, el FAME concomitante fue una combinación, siendo el metotrexato más leflunomida la más común.

En la subpoblación del estudio inmunofenotípico, casi todos los ciclos naïve correspondieron a 2 infusiones de 1000 mg de RTX. Sin embargo, en el 28% de los ciclos sucesivos solamente se administró 1000 mg de RTX. Como hemos señalado anteriormente, este perfil de administración de RTX, aunque infrecuente al comienzo de nuestra experiencia, era común en el momento de la realización del estudio del inmunofenotipo¹³⁴. Una información más detallada para la subpoblación con inmunofenotipo se aporta en la sección de resultados¹³⁴.

Tabla 9: FAMEs concomitantes con tratamiento con RTX.

	Año de comienzo con RTX				Número de ciclos con RTX			Total (n=409)
	≤ 2008 (n=225)	2009-11 (n=129)	2012-14 (n=55)	p	n≤2 (n=194)	n≥3 (n=215)	p	
Metotrexato	116 (51.6%)	62 (48.1%)	33 (60.0%)	0.337	102 (52.9%)	109 (50.7%)	0.766	211 (51,6%)
Leflunomida	73 (32.4%)	58 (45.0%)	15 (27.3%)	0.024	67 (34.5%)	79 (36.7%)	0.680	146 (35,7%)
Hidroxicloroquina	22 (9.8%)	7 (5.4%)	2 (3.6%)	0.187	14 (7.2%)	17 (7.9%)	0.853	31 (7,6%)
Sulfasalazina	0 (0.0%)	11 (8.5%)	1 (1.8%)	0.000	6 (3.1%)	6 (2.8%)	1.000	12 (2,9%)
otros FAMEs	7 (3.1%)	3 (2.3%)	0 (0.0%)	0.544	7 (3.6%)	3 (1.4%)	0.203	10 (2,4%)
monoterapia RTX	25 (11.1%)	20 (15.5%)	13 (23.6%)	0.054	33 (17.0%)	25 (11.6%)	0.155	58 (14,2%)

Abreviaturas: n: número; RTX: rituximab; FAMEs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; otros FAMEs: ciclosporina, azatioprina.

Tabla 10: Terapias previas a rituximab.

	N (%)
FAMEs biológicos	92 (80.7%)
Inhibidores de TNF	87 (76.3%)
Abatacept	5 (4.4%)
Tocilizumab	4 (3.5%)
Razones para la suspensión	
Falta de efectividad	88 (77.5%)
Reacciones adversas	17 (14.8%)
Otras razones	8 (7.7%)
FAMEs no biológicos	102 (89.5%)
Metotrexato	55 (48.3%)
Leflunomida	59 (51.8%)
Hidroxicloroquina	41 (36.0%)
Sulfasalazina	35 (30.7%)
Ciclosporina	14 (12.3%)
Azatioprina	4 (3.5%)

Abreviaturas: FAMEs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad.

6. Declaraciones éticas

El estudio RITAR se realizó de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki de 1983. RITAR fue considerado por la Agencia Española de Medicamentos y Dispositivos Médicos (AEMPS) como un estudio observacional (EPA-OD) y fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario La Princesa (número de código 2903A), que no consideró necesario solicitar el consentimiento por escrito de los pacientes. Esto es debido a que el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Princesa hace seguimiento de forma rutinaria de la depleción de LB y su repoblación en SP, por lo que se consideró que el presente estudio se realizó con excedentes de las muestras extraídas en la práctica clínica habitual en el centro. No obstante, se informó a los pacientes sobre el estudio y se obtuvo el consentimiento verbal para el uso de los excedentes.

7. Muestra

Se obtuvieron muestras de SP en tubos de 5 mL con anticoagulante ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA). Las muestras fueron transportadas a temperatura (T^a) ambiente al laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario La Princesa. Las muestras que no se pudieron procesar en las primeras dos horas tras su extracción fueron guardadas a 4°C durante un máximo de 24 horas.

El cronograma de toma de muestras para el estudio fue el siguiente: la primera muestra se obtenía al inicio del tratamiento (T_0), con la extracción de sangre inmediatamente anterior a la infusión RTX y luego se recogían muestras de SP a los 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 meses, si no hubo recaída previamente.

8. Materiales

Anticuerpos monoclonales empleados en el estudio inmunofenotípico de subpoblaciones linfocitarias B y T.

En la tabla 11 se detallan los anticuerpos monoclonales (AcMo) utilizados para el estudio del IF de las subpoblaciones de linfocitos B y T en SP.

Tabla 11: Anticuerpos monoclonales para el estudio de sangre periférica de las subpoblaciones de linfocitos B y T. Se detallan los fluorocromos, casa comercial, isotipo y clon.

Anticuerpo monoclonal	Fluorocromo	Casa comercial	Isotipo	clon
CD24	FITC	BD	Mouse IgG2a, κ	ML5
CD27	FITC	BD	Mouse BALB/c IgG1	L128
IgD	FITC	BD	Mouse BALB/c IgG2a, κ	IA6-2
CD279	PE	BD	Mouse IgG1, κ	MIH4
CD21	PE	BD	Mouse IgG1, κ	B-ly4
CCR6	PE	BD	Mouse IgG1, κ	11A9
CCR7	PE	RyD	IgG2a	# 150503
CD27	PerCP-Cy5.5	BD	Mouse BALB/c IgG1	L128
CD3	PerCP-Cy5.5	BD	Mouse BALB/c IgG1, κ	SK7
CD25	PE-Cy7	BD	Mouse BALB/c IgG1, κ	2A3
CD19	PE-Cy7	BD	Mouse BALB/c IgG1, κ	SJ25C1
CD45RA	APC	BD	Mouse IgG2b, κ	HI100
IgM	APC	BD	Mouse IgG1, κ	G20-127
CXCR5	Alexa fluor 647	BD Pharmingen	LOU/M IgG2b, κ	RF8B2
CD38	APC	BD	Mouse IgG1, κ	HB7
CD10	APC-H7	BD	Mouse BALB/c IgG1, κ	HI10a
CD38	APC-H7	BD	Mouse IgG1, κ	HB7
CD8	APC-H7	BD	Mouse BALB/c IgG1, κ	SK1
CD4	Pacific Blue	BD	Mouse IgG1, κ	RPA-T4
CD20	Pacific Blue	BioLegend	Mouse IgG2b, κ	2H7
CD45	Horizon V500	BD	Mouse IgG1, κ	HI30

Abreviaturas: FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP-Cy5.5: complejo de proteína clorofila peridina conjugado con cianina 5; PE-Cy7: ficoeritrina conjugado con cianina7; APC: Alofocianina; APC-H7: Alofocianina conjugada con H7

9. Métodos

Inmunofenotipo en sangre periférica mediante citometría de flujo multiparamétrica

En un periodo máximo de 24 horas siguientes a la extracción, se analizó el inmunofenotipo de las muestras de SP enviadas al laboratorio de Inmunología del Hospital Universitario La Princesa. El análisis se realizó mediante citometría de flujo (CMF) multiparamétrica de ocho colores en el citómetro FACSCanto II (Becton Dickinson, USA), previamente calibrado y compensado. La calibración del equipo se realizó empleando distintos tipos de microesferas y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la compensación del equipo se utiliza una muestra de SP incubada con las combinaciones de AcMo conjugados con las fluorescencias indicadas en las tablas 12, 13, 15 y se ajustan las señales de fluorescencia de cada detector con el fin de asegurar una discriminación adecuada entre las señales positivas y negativas. La estrategia para seleccionar el umbral de positividad para una determinada molécula se realizó teniendo en cuenta como negativas aquellas

poblaciones celulares presentes en la muestra, semejantes en tamaño y complejidad a la subpoblación linfocitaria de interés, y que no expresan la molécula en cuestión.

9.1. Cuantificación de linfocitos B y caracterización de sus subpoblaciones de sangre periférica por citometría de flujo

Con el fin de asegurarnos la presencia de células B en SP, antes de la caracterización de las subpoblaciones linfocitarias B se procedió a la cuantificación de los linfocitos B totales en SP en cada muestra. Para ello, se empleó un panel reducido de anticuerpos (tabla 12) que se incubaron con 100 μ L de SP total durante 20 min a temperatura ambiente y agitación en tubos con esferas TruCOUNT (BD) diseñados para realizar recuentos absolutos de la subpoblación de interés (la presencia de un número conocido de microesferas fluorescentes en cada tubo permite el cálculo del número de eventos por microlitro de la población marcada).

Tabla 12: Panel de anticuerpos monoclonales para la cuantificación de linfocitos B por CMF

	FITC	PE	PerCP-Cy5	APC	PB
1	CD8	CD3	CD45	CD19	CD4

Abreviaturas: CMF: citometría de flujo; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP-Cy5.5: complejo de proteína clorofila peridina conjugado con cianina 5; APC: Aloficocianina; PB: Pacific Blue.

Tras la incubación se siguió un protocolo de lisado no lavado de muestras y se adquirió un mínimo de 10^6 eventos totales usando el software de adquisición y análisis FACSDiva (BD Biosciences). El análisis cuantitativo del número de linfocitos B en SP se realizó con un perfil definido por nuestro grupo en el software de análisis de citometría Infinicyt (Cytognos, Salamanca, España,) teniendo en cuenta el número de eventos celulares en el *gate* de células B positivas para CD19, el número de microesferas adquiridas, el número de microesferas en los tubos TruCOUNT proporcionado por el fabricante y los microlitros que se usaron para el marcaje.

Cuando el valor absoluto de linfocitos B era igual o mayor de 5 células B/ μ L, se procedió a realizar el estudio de las distintas subpoblaciones de linfocitos B. Para ello, un total de 100 μ L de SP completa se incubó con la combinación de AcMo indicados en la tabla 13 durante 15 minutos en agitación y oscuridad. Los volúmenes de AcMo utilizados se establecieron en base a los resultados de estudios previos de titulación. Tras la incubación, se añadieron 1,5 mL de solución de FACS lisis (BD) durante 10 minutos, en agitación a Tª ambiente. Trascurrido el tiempo de lisado, se realizaron dos lavados con PBS, se suspendió el pellet de células resultante del segundo lavado en 200 μ L de PBS

quedando así la muestra preparada para ser analizada en el citómetro. Las muestras fueron adquiridas inmediatamente después del marcaje.

Tabla 13: Panel de anticuerpos monoclonales para el análisis de las subpoblaciones de linfocitos B por CMF

	FITC	PE	PerCP-Cy5	PECY7	APC	APCH7	PB	V500
1	IgD	CCR6	CD27	CD19	IgM	CD38	CD20	CD45
2	CD24	CD21	CD27	CD19	CD38	CD10	CD20	CD45

Abreviaturas: CMF: citometría de flujo; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP-Cy5.5: complejo de proteína clorofila peridina conjugado con cianina 5; PE-Cy7: ficoeritrina conjugado con cianina7; APC: Aloficocianina; APC-H7: Aloficocianina conjugada con H7; PB: Pacific Blue; V500: Horizon V500.

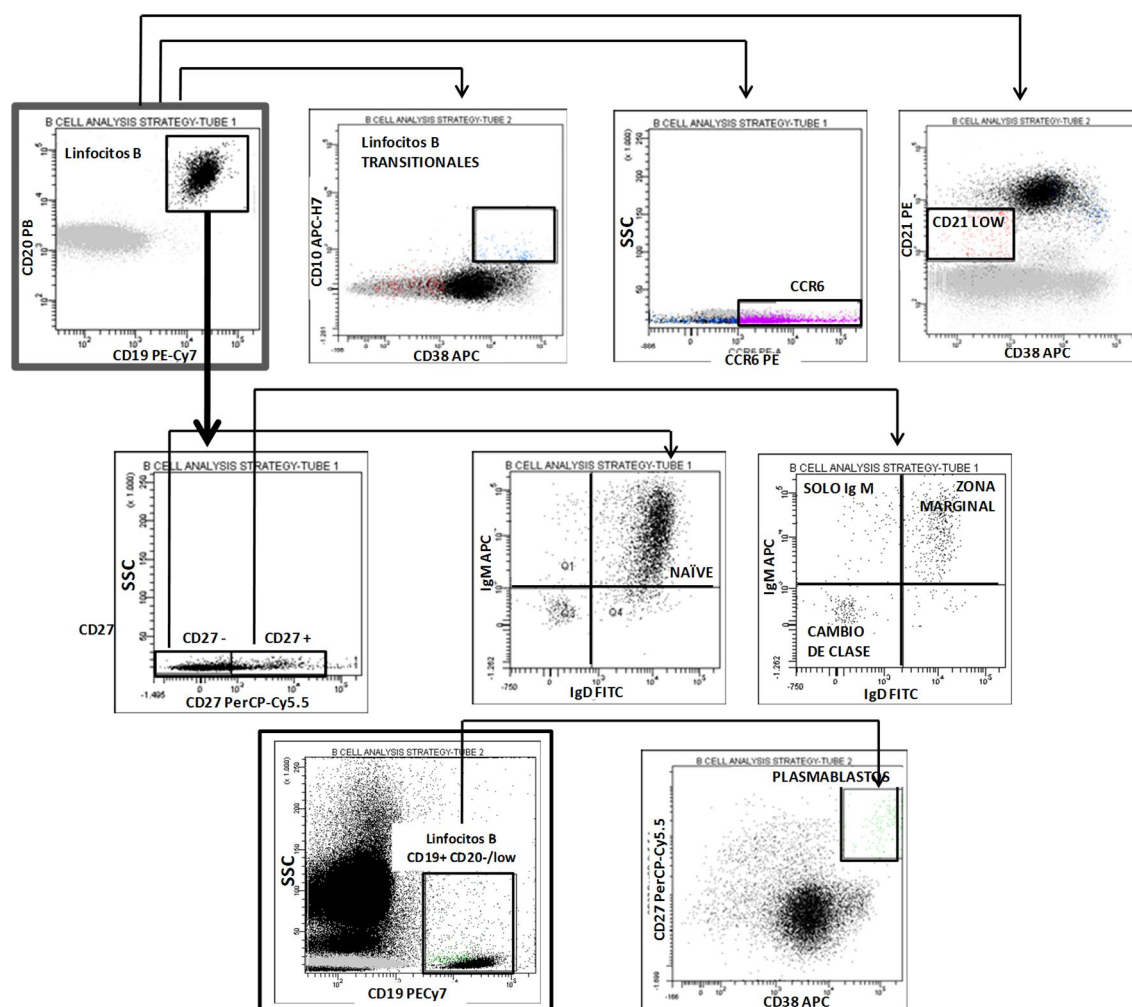
Se adquirieron al menos 100,000 eventos totales. En aquellos casos en los que una o más subpoblaciones linfocitarias eran muy escasas se procedió a continuar con la adquisición de la muestra hasta alcanzar un mínimo de 20 células en todas las subpoblaciones estudiadas.

Los datos se analizaron con el software FACSDiva (BD). Las subpoblaciones de linfocitos B se definieron de acuerdo con la estrategia mostrada en la figura 4 de la siguiente manera:

Tabla 14: Inmunofenotipo de las subpoblaciones de linfocitos B.

Subpoblación linfocitos B	Inmunofenotipo
Linfocitos B	CD45+ CD19+ CD20+
Linfocitos B transicionales	CD19+ CD20+ CD24+ CD10+ CD38++
Linfocitos B naïve	CD19+ CD20+ CD27- IgM+ IgD+
Linfocitos B de memoria totales	CD19+ CD20+ CD27+
Linfocitos B de memoria de la zona marginal	CD19+ CD20+ CD2+ IgM+ IgD+
Linfocitos B de memoria solo IgM	CD19+ CD20+ CD27+ IgM+ IgD-
Linfocitos B de memoria con cambio de clase	CD19+ CD20+ CD27+ IgM- IgD-
Linfocitos B CD21low	CD19+ CD20+ CD21low/- CD38low/-
Linfocitos B CCR6+	CD19+ CD20+ CCR6+
Plasmablastos	CD19+ CD20-/low CD38++ CD27++

Figura 4: Estrategia de análisis utilizada para la identificación de subpoblaciones de linfocitos B de acuerdo con su estadio madurativo según el inmunofenotipo indicado en la tabla 14.



Linfocitos B de memoria IgM (CD19 + CD20 + CD27 + IgM + IgD-), linfocitos B de memoria con cambio de clase (CD19 + CD20 + CD27 + IgM- IgD-), transicionales (CD19 + CD20 + CD24 + CD10 + CD38 ++), naïve (CD19 + CD20 + CD27- IgM + IgD +), de memoria de zona marginal (MZL) (CD19 + CD20 + CD27 + IgM + IgD +), plasmablastos (CD19 + CD20-/low CD38 ++ CD27 ++), y linfocitos B CD21low (CD19 + CD20 + CD21low/- CD38low/-) y CCR6+ (CD19 + CD20 + CCR6 +), de acuerdo con su patrón de expresión de CD19, CD20, CD24, CD21, CD27, CD38, CCR6, smlgM y smlgD y sus características de dispersión lateral (SSC).

9.2. Análisis de subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo

Las distintas subpoblaciones de linfocitos T se caracterizaron y cuantificaron por CMF con el mismo protocolo descrito para los linfocitos B pero utilizando los paneles de anticuerpos que se detallan en la tabla 15.

Tabla 15: Panel de anticuerpos monoclonales para análisis de subpoblaciones de linfocitos T por CMF.

	FITC	PE	PerCP-Cy5	PECY7	APC	APCH7	PB	V500
1		PD1	CD3	CD25	CXCR5	CD8	CD4	CD45
2		CXCR6	CD3		CCR6	CD8	CD4	CD45
3	CD27	CCR7	CD3		CD45RA	CD8	CD4	CD45

Abreviaturas: CMF: citometría de flujo; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCP-Cy5.5: complejo de proteína clorofila peridina conjugado con cianina 5; PE-Cy7: ficoeritrina conjugado con cianina 7; APC: Aloficocianina; APC-H7: Aloficocianina conjugada con H7; PB: Pacific Blue; V500: Horizon V500.

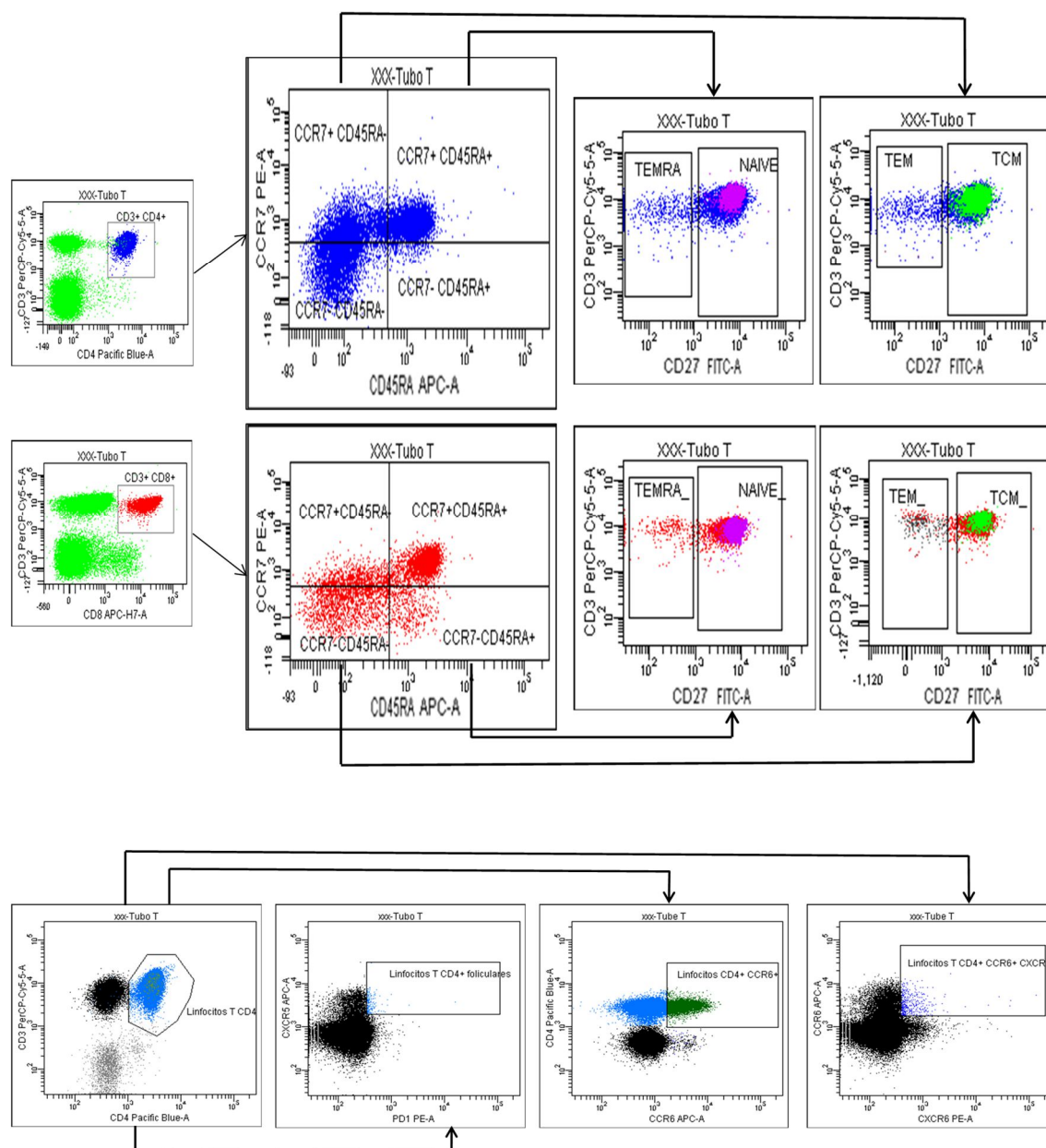
Se adquirieron al menos 100,000 eventos totales. En aquellos casos en los que una o más subpoblaciones linfocitarias eran muy escasas se procedió a continuar con la adquisición de la muestra hasta alcanzar un mínimo de 20 células en todas las subpoblaciones estudiadas.

Los datos se analizaron con el software FACSDiva (BD). Las subpoblaciones de células T se asignaron de acuerdo con la estrategia mostrada en la figura 5 de la siguiente manera:

Tabla 16: Inmunofenotipo de las subpoblaciones de linfocitos T.

Subpoblación linfocitos T	Inmunofenotipo
Linfocitos T	CD45+ CD3+
Linfocitos T CD4+	CD3+ CD4+
Linfocitos T CD4+ naïve	CD4+ CD45RA+CCR7+ CD27+
Linfocitos T CD4+ Memoria Central	CD4+ CD45RA- CCR7+ CD27+
Linfocitos T CD4+ Efectores de Memoria RA-	CD4+ CD45RA- CCR7- CD27-
Linfocitos T CD4+ Efectores de Memoria RA+	CD4+ CD45RA+ CCR7- CD27-
Linfocitos TCD8+	CD3+ CD8+
Linfocitos T CD8+ naïve	CD8+ CD45RA+ CCR7+ CD27+
Linfocitos TCD8+ Memoria Central	CD8+ CD45RA- CCR7+ CD27+
Linfocitos T CD8+ Efectores de Memoria	CD8+ CD45RA- CCR7- CD27-
Linfocitos T CD8+ Efectores de Memoria RA+	CD8+ CD45RA+ CCR7- CD27-
Linfocitos T CD4+ CD25++	CD4+CD25++
Linfocitos T CD4+ foliculares	CD4+ PD1+ CXCR5+
Linfocitos T CD4+ CXCR6+CCR6+	CD4+ CXCR6+ CCR6+
Linfocitos T CD4+ CCR6+	CD4+ CCR6+

Figura 5: Estrategia de análisis utilizada para la identificación de subpoblaciones de linfocitos T según el inmunofenotipo indicado en la tabla 16.



*Linfocitos T CD4+ naïve (CD4+ CD45RA+ CCR7+ CD27+); linfocitos T CD4+ de memoria central (CD4+ CD45RA- CCR7+ CD27+); linfocitos T CD4+ memoria efectora RA+ (CD4+ CD45RA- CCR7- CD27-); linfocitos T CD4+ memoria efectora RA- (CD4+ CD45RA+ CCR7- CD27-); linfocitos T CD8+ naïve (CD8+ CD45RA+ CCR7+ CD27+); linfocitos T CD8+ de memoria central (CD8+ CD45RA- CCR7+ CD27+); linfocitos T CD8+ memoria efectora RA- (CD8+ CD45RA- CCR7- CD27-); linfocitos T CD8+ memoria efectora RA+ (CD8+ CD45RA+ CCR7- CD27-); linfocitos T CD4+ CD25+; linfocitos T CD4+ foliculares (CD4+ PD1+ CXCR5+); linfocitos T CD4+ CXCR6+ CCR6+; linfocitos T CD4+ CCR6+, de acuerdo con su patrón de expresión de CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, CD27, CD25, PD1, CXCR5, CCR6 Y CXCR6 y sus características de dispersión lateral (SSC). **Abreviaturas:** TCM: Linfocitos T de memoria central; TEM: linfocitos T de memoria efectora RA-; TEMRA: linfocitos T memoria efectora RA+*

10. Estadística

La mediana de la duración de la respuesta en nuestra población se ha descrito en 10 meses¹³⁴, de manera que en el 50% de los pacientes se ha reactivado la enfermedad, lo que lleva a que los médicos indiquen un nuevo ciclo RTX. Por lo tanto, los datos más allá del mes 8 fueron disminuyendo gradualmente imposibilitando la realización de un análisis estadístico adecuado. Por este motivo, decidimos censurar el análisis de los datos en el mes 8 ya que en esta visita la mayoría de los pacientes habían comenzado la repoblación de linfocitos B sin recaída de la enfermedad.

En resumen, para la realización del estudio se analizaron las muestras a T0, T3, T6 y T8.

El análisis estadístico se realizó con Stata v.13.1 (StataCorp, College Station, TX, EE. UU.).

Las variables cuantitativas se representaron como la media \pm desviación estándar (DE), ya que el total de n fue superior a 30, la homoscedasticidad se evaluó mediante la prueba de Levene y la mayoría de las variables cumplieron estos criterios. Por lo tanto, estas variables se analizaron mediante la prueba t (sucesivos vs naïve). Cuando existieron múltiples grupos (diferente número de ciclos sucesivos) se analizaron con el comando `np trend` de Stata que realiza la prueba no paramétrica de Cuzick para la tendencia en todos los grupos ordenados. Las variables categóricas se expresaron como porcentajes y los niveles de significación entre los grupos se establecieron utilizando la prueba χ^2 o la prueba exacta de Fisher.

Se realizó el análisis estadístico a T0, T3, T6 y T8, para las subpoblaciones T, mientras que solamente se utilizaron las visitas T0 y T8 para realizar el análisis estadístico de las subpoblaciones de linfocitos B, ya que como se describió anteriormente, pocos pacientes tenían linfocitos B en las visitas de 3 y 6 meses. Se usó la prueba t de Student y, dado que se realizaron comparaciones múltiples, el umbral de significación se estableció, según la corrección de Bonferroni, en $p < 0,005$ para los linfocitos B y $p < 0,003$ para los linfocitos T. Además, considerando que estudiamos medidas repetidas (diferentes ciclos de rituximab) para cada paciente, se realizó un análisis de sensibilidad utilizando modelos de datos de panel promediados de la población a través del comando `xtgee` de Stata. Este comando permite el análisis de ajuste utilizando ecuaciones de estimación generalizadas anidadas por paciente y ciclo para ajustar las mediciones repetidas. Este enfoque produjo casi los mismos resultados que con la prueba t de Student (datos no mostrados).

La prueba de Pearson se utilizó para analizar la correlación entre la actividad de la enfermedad y las subpoblaciones de células B y T de referencia. Para generar las gráficas que muestran la recta de regresión con su área de intervalo de confianza al 95%, se utilizó el comando de Stata `twoway` con la opción `lfitci`.

RESULTADOS

1. Características de los pacientes

La caracterización y cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias se llevaron a cabo en 69 pacientes de los 114 que participaron en el estudio RITAR, y en un total de 114 ciclos, de los cuales 29 fueron ciclos naïve y 85 ciclos sucesivos. Para poder determinar si los datos obtenidos en el estudio del inmunofenotipo de las subpoblaciones linfocitarias B y T pueden ser extrapolados al estudio RITAR completo, se compararon los datos basales de las dos subpoblaciones, como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17: Comparación de los datos basales de la población del estudio RITAR en el grupo sin y con estudio del inmunofenotipo (EIF).

		sin EIF	Con EIF	p
Femenino, n (%)		36(76%)	54 (84 %)	0,261
Años de inicio; (años; p50 [RIC])		47 (43-52)	49 (45-52)	0,62
Edad comienzo RTX (años; p50 [RIC])		59 (55-63)	60 (57-62)	0,605
Complicaciones de AR, n (%)				0,249
	0	34 (68%)	34 (53%)	
	1-2	15 (30%)	29 (45%)	
	> 2	1 (2%)	1 (1,5%)	
Comorbilidades, n (%)				0,627
	0	15 (30%)	16 (25%)	
	1-2	24 (48%)	29 (45%)	
	≥ 2	11 (22%)	19 (30%)	
RF y/o ACPA positivo (%)		44 (88 %)	62 (96,9%)	0,066
FAMEs previos, (p50 [RIC])		2,2 (1,8-2,6)	2,2 (1,8-2,5)	0,908
TB previo (p50 [RIC])				0,499
	1-2	43 (86%)	52 (81%)	
	≥ 3	7 (14%)	12 (19%)	
Monoterapia RTX		9 (18%)	10 (16%)	0,736
DAS28 al ciclo 1 (p50 [RIC])		5,0 (4,6-5,4)	5,4 (5,1-5,7)	0,091
HAQ al ciclo 1 (p50 [RIC])		1,0 (0,6-1,6)	1,4 (1,2-1,6)	0,03
VSG al ciclo 1 (p50 [RIC])		38,4 (31,4-45,5)	40,6 (33,9-47,5)	0,66
NAD al ciclo 1 (p50 [RIC])		7,1 (5,3-8,8)	8,7 (7,0-10,4)	0,187
NAT al ciclo 1 (p50 [RIC])		5,4 (4,0-6,8)	5,9 (4,9-6,8)	0,529
VGP al ciclo 1 (p50 [RIC])		58,1 (50,3-65,9)	62,4 (56,4-68,3)	0,383
VGM al ciclo 1 (p50 [RIC])		45,3 (38,4-52,2)	50,4 (42,0-58,3)	0,385
RM al ciclo 1 (p50 [RIC])		129,1 (46,1-304,3)	68,3 (47,7-88,8)	0,384

Abreviaturas: EIF: estudio del inmunofenotipo; n: numero; RIC: rango intercuartílico; FR: factor reumatoide; ACPA: anticuerpos anti proteínas citrulinadas; p50: percentil 50 o mediana; AR: artritis reumatoide; FAMEs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad; TB: terapia biológica; DAS28: (siglas del inglés disease activity score based on a 28-joint count) puntuación de actividad de la enfermedad calculada con el recuento de 28 articulaciones; HAQ: Cuestionario de Evaluación de la Salud; NAD: número de articulaciones dolorosas; NAT: número de articulaciones tumefactas; VSG: velocidad de sedimentación globular; VGP: valoración global por parte del paciente; VGM: valoración de la enfermedad por el médico; RM: tiempo de duración de la rigidez matutina.

Como muestra en la tabla 17 no hubo diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las variables recogidas para la caracterización de los pacientes. A pesar de ello, se observó una tendencia a un mayor porcentaje de pacientes con enfermedad seropositiva en la subpoblación con estudio del Inmunofenotipo (FR y/o ACPA +; $p=0,066$) ya que estos pacientes se estudiaron en la segunda mitad del estudio RITAR, en la cual se trataban menos pacientes seronegativos. Dado que la seropositividad para FR y/o ACPA se asocia con mayor gravedad de la enfermedad, consecuentemente hubo una tendencia a una mayor actividad de la enfermedad en la visita basal del primer ciclo de los pacientes con estudio del inmunofenotipo ($p=0,091$), y por lo tanto, una mayor discapacidad ($p=0,03$). No obstante, se puede considerar que, en general, los pacientes del estudio RITAR con estudio inmunofenotípico, son representativos del conjunto de la población tratada con RTX en el Hospital Universitario La Princesa.

Por otra parte, para una mejor caracterización del posible efecto acumulativo de los ciclos de RTX, los pacientes que habían recibido ciclos sucesivos del fármaco se clasificaron en 3 grupos en función del número de ciclos recibidos y se compararon de nuevo sus características basales, según se describe en la tabla 18. No se observaron diferencias significativas entre los pacientes de ciclos naïve, ni ninguno de los tres grupos de ciclos sucesivos en cuanto a género, edad al inicio de la enfermedad, ni seropositividad. Se detectó una tendencia según la cual los pacientes con mayor número de ciclos tenían una mayor duración de la enfermedad. Sin embargo, se observó que la actividad de la enfermedad medida por DAS28 en la visita basal, fue disminuyendo de forma significativa a medida que aumentaba el número de ciclos administrados ($p=0,014$, tabla 18). Esto sugiere que, aunque en el Hospital Universitario La Princesa se administre RTX a demanda, cuantos más ciclos se administran, los pacientes y sus reumatólogos son capaces de ajustar mejor el momento de una nueva infusión antes de que se produzca un brote de la enfermedad. Por último, el porcentaje de ciclos de 1 g frente a los de 2g fue aumentando de forma significativa de un 9% en los ciclos naïve hasta un 44% en los ciclos por encima del 6º ($p=0,03$; tabla 18). Ello es debido a que, cuando se comenzó a usar el fármaco, se prescribían 2 g en total repartidos en dos dosis de 1 g administrados en el tiempo 0 y a los 15 días.

Tabla 18: Características basales de los pacientes clasificados según el número de ciclos de rituximab.

	Ciclos naïve	Ciclos sucesivos (85)			p
	N	S1	S2	S3	
n	29	28	32	25	
Género femenino	26 (90%)	25 (89%)	28 (87.5%)	21 (84%)	0.924
Edad al inicio de la enfermedad (años)	48.5 ± 15.5	50.9 ± 12.4	45.0 ± 9.7	47.7 ± 13.3	0.365
Duración de la enfermedad (años)	12.0 ± 8.7	13.1 ± 6.8	14.0 ± 6.8	16.8 ± 6.9	0,119
FR positivo	28 (96.5%)	28 (100%)	30 (94%)	23 (92%)	0,226
Ciclos 1000 mg. n (%)	2 (9%)	7 (22%)	11 (36%)	12 (44%)	0,03
DAS28 a T0	5.1 ± 1.3	4.9 ± 0.9	4.8 ± 1.3	4.6 ± 1.0	0,014

Abreviaturas: FR: factor reumatoide; DAS28: puntuación de actividad de la enfermedad calculada con el recuento de 28 articulaciones. N: ciclos naïve; S1: 2º y 3º ciclos sucesivos; S2: 4º y 5º ciclos sucesivos; S3: 6º ciclo y superiores. Los datos se muestran como la media ± desviación estándar o número absoluto (porcentaje)

2. Evolución de las subpoblaciones de linfocitos B y T tras varios ciclos de RTX.

Antes de realizar la comparación de las distintas subpoblaciones linfocitarias de SP en los pacientes que habían recibido su primer ciclo de RTX y los que habían recibido ciclos sucesivos, se analizó el porcentaje de los diferentes tipos de linfocitos B y T entre los diferentes grupos de ciclos sucesivos, para determinar si RTX induce cambios acumulativos en alguna de dichas subpoblaciones linfocitarias.

2.1. Subpoblaciones de linfocitos B:

Se compararon los datos a T0 de los pacientes de los 3 grupos que recibieron ciclos sucesivos descritos en la tabla 18. Como se muestra en la Figura 6, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos en el porcentaje de los linfocitos B totales ni en ninguna de sus subpoblaciones, incluyendo linfocitos B transicionales, naïve y los distintos tipos de linfocitos B de memoria. La única excepción fue una tendencia no significativa a un menor porcentaje de plasmablastos en los pacientes con un número creciente de ciclos de RTX administrados.

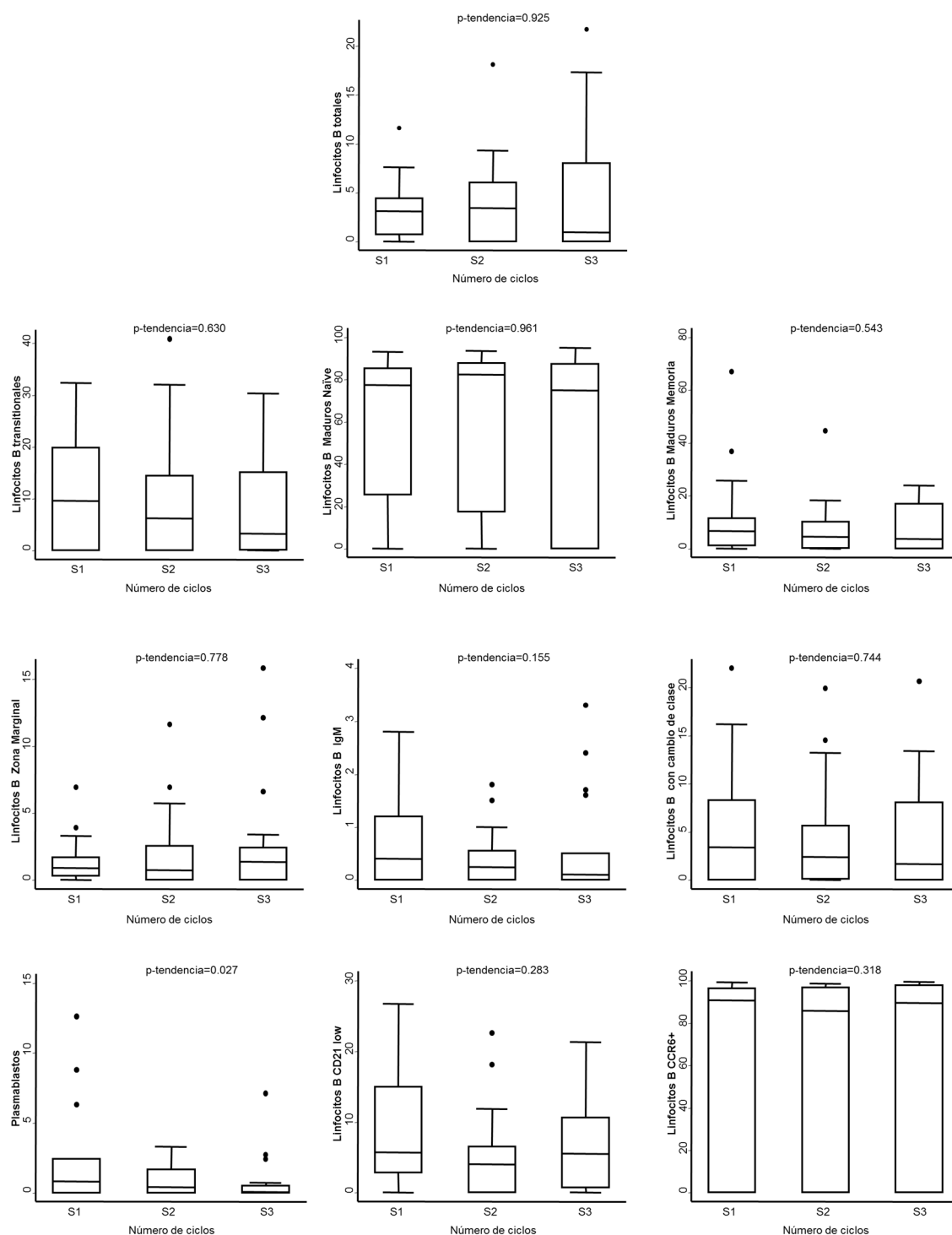


Figura 6: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos B en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3ºciclo; S2:4ºciclo y 5º ciclo; S3: 6ºciclo y superiores). Los datos representan el porcentaje con respecto al total de linfocitos en la primera fila de la figura y el porcentaje con respecto a los linfocitos B en todas las demás gráficas. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo la caja). Se usó la prueba de tendencia de Cuzick para determinar la significación estadística que se estableció en $p < 0,005$ debido a las comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

2.2. Subpoblaciones de linfocitos T:

Al igual que sucedía con los linfocitos B, los ciclos sucesivos de administración de RTX tampoco provocaban un cambio en el porcentaje de linfocitos T totales, ni en las proporciones de linfocitos T CD8+ o T CD4+, ni en ninguna de las correspondientes subpoblaciones de estos últimos, incluyendo linfocitos T naïve, memoria central o efectores (RA+ o RA-), en las visitas basales de cada ciclo (figuras 7 y 8).

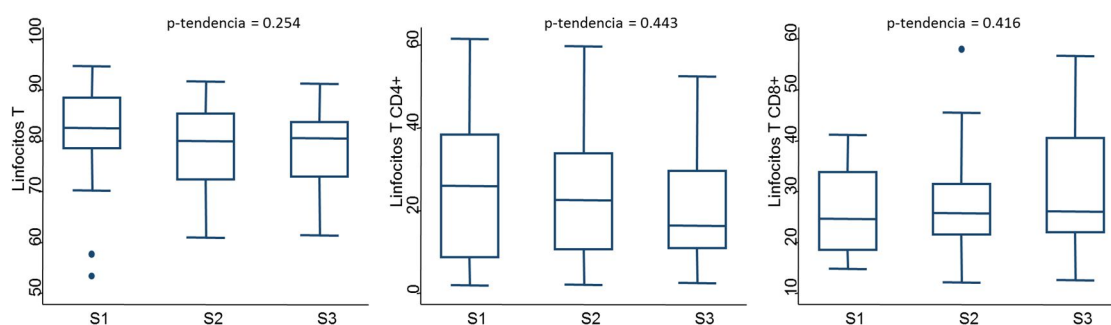


Figura 7: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3ºciclo; S2:4ºciclo y 5º ciclo; S3: 6ºciclo y superiores). Los datos representan el porcentaje con respecto al total de linfocitos en el primer panel y el porcentaje con respecto a los linfocitos T en el resto. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre el cuadro) y p5 (línea debajo de la caja). Se usó la prueba de tendencia de Cuzick para determinar la significación estadística que se estableció en $p < 0,003$ debido a las comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

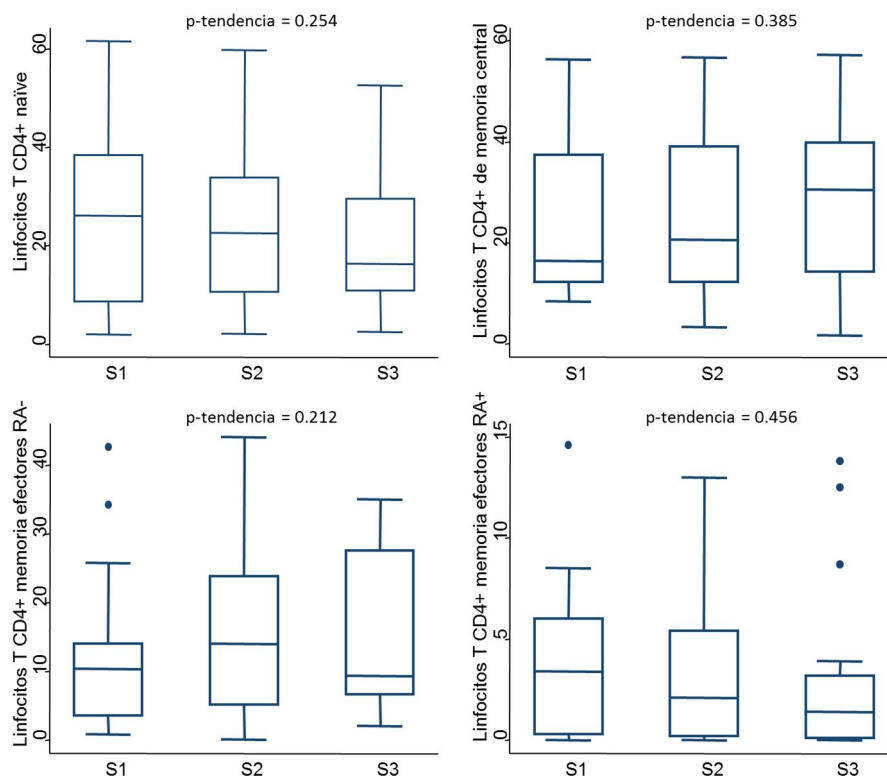


Figura 8: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ definidas por la exposición a antígeno, en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3º ciclo; S2: 4º ciclo y 5º ciclo; S3: 6º ciclo y superiores). Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T de las poblaciones de linfocitos T CD4+ naïve (CD4+ CD45RA+ CCR7+ CD27+); linfocitos T CD4+ de memoria central (CD4+ CD45RA- CCR7+ CD27+); linfocitos T CD4+ memoria efectores RA- (CD4+ CD45RA- CCR7- CD27-); linfocitos T CD4+ memoria efectores RA+ (CD4+ CD45RA+ CCR7- CD27-). Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). Se usó la prueba de tendencia de Cuzick para determinar la significación estadística que se estableció en $p < 0,003$ debido a las comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

Además, en los linfocitos CD4+, también nos interesó analizar un posible papel acumulativo del tratamiento en distintas subpoblaciones T a las que se les ha atribuido un papel patogénico en la AR, por si pudieran verse afectadas por la eliminación repetida de linfocitos B con rituximab. En este sentido, no se observaron diferencias en las proporciones de linfocitos T CD4+ CD25++ que incluyen a poblaciones de células T reguladoras. Tampoco se observó un efecto acumulativo en el porcentaje de linfocitos T CD4+ CCR6+ que incluyen entre otras a las subpoblaciones Th17 y Th22, ni en los linfocitos T CCR6 que coexpresan CXCR6+, un receptor de quimiocinas que se ha visto implicado en el extravasación de los linfocitos T hacia los tejidos inflamados, incluyendo la membrana sinovial en la patología que nos ocupa. Sin embargo, aunque sin llegar a tener significación estadística, se observó una tendencia según la cual los linfocitos T foliculares, definidos por el fenotipo CD4+ PD1+ CXCR5+, eran más bajos en los casos que habían recibido cuatro o más ciclos de RTX (figura 9; p-tendencia=0.071)

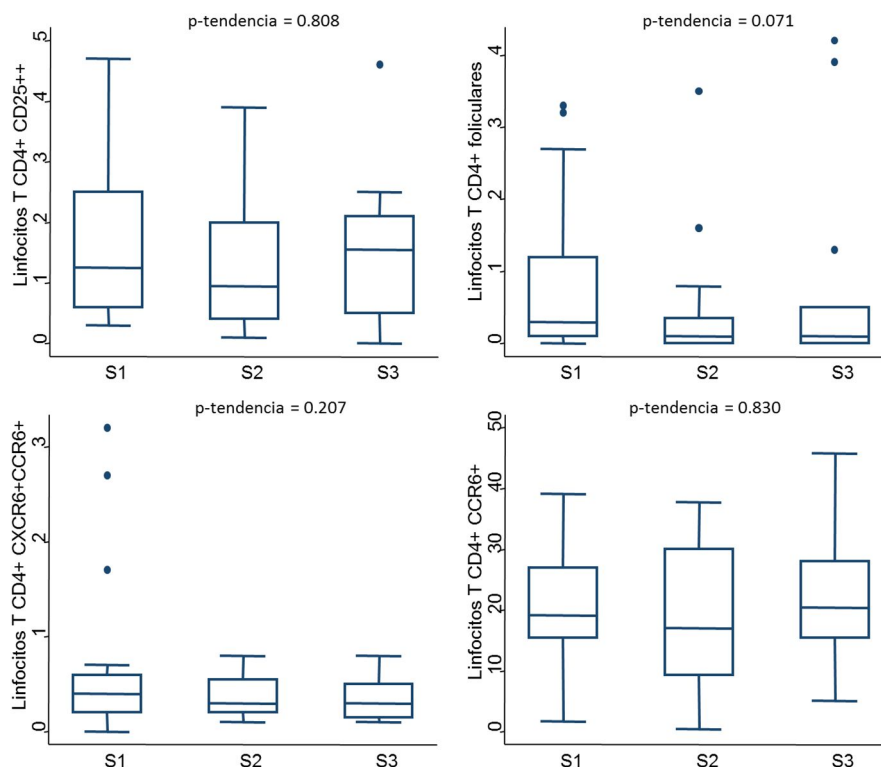


Figura 9: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con posible papel patológico en AR, en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3º ciclo; S2: 4º ciclo y 5º ciclo; S3: 6º ciclo y superiores). Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T de las poblaciones de linfocitos T CD4+ CD25++; linfocitos T CD4+ foliculares (CD4+ PD1+ CXCR5+); linfocitos T CD4+ CXCR6+ CCR6+; linfocitos T CD4+ CCR6+. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). Se usó la prueba de tendencia de Cuzick para determinar la significación estadística que se estableció en $p < 0,003$ debido a las comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

Por su parte, las proporciones de las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8+ analizadas permanecen estables en las visitas basales a lo largo de los sucesivos ciclos de RTX administrados, no mostrando diferencias significativas entre los diferentes grupos (figura 10).

A la vista de los resultados obtenidos, tanto con las subpoblaciones de linfocitos B como de linfocitos T, se decidió considerar todos los ciclos sucesivos como un grupo homogéneo para los análisis comparativos con los ciclos naïve, ya que no encontramos evidencia sólida en nuestros datos de que se produzcan efectos acumulativos en las distintas subpoblaciones linfocitarias asociados a la repetición de ciclos de rituximab.

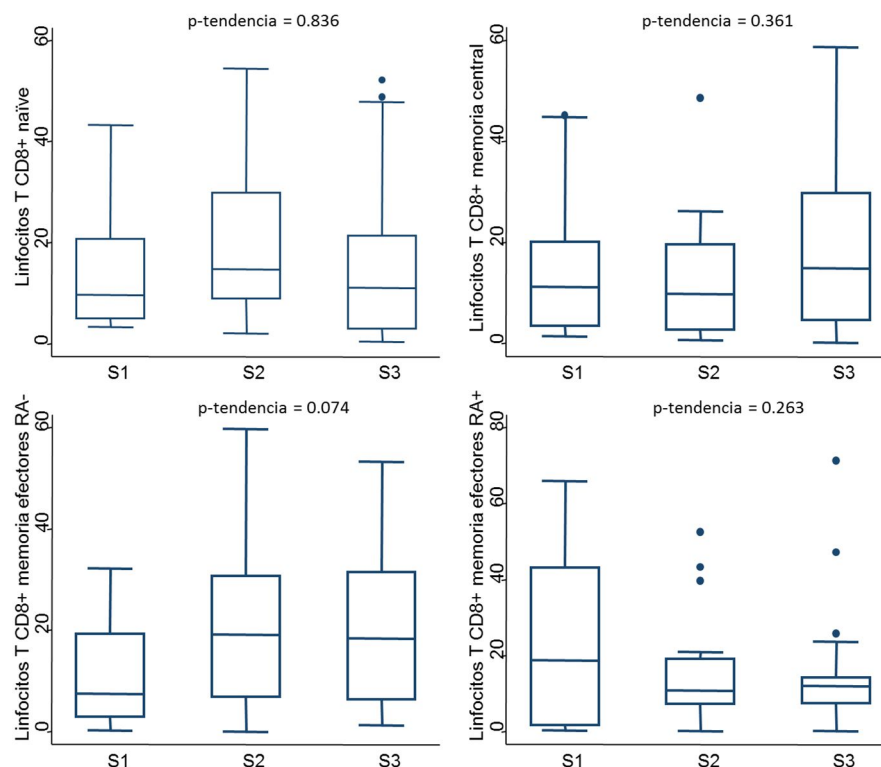


Figura 10: Diferencias entre las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en la visita inicial entre los pacientes que habían recibido 2 o más ciclos de rituximab, divididos en tres grupos (S1: 2º ciclo y 3º ciclo; S2: 4º ciclo y 5º ciclo; S3: 6º ciclo y superiores). Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T de las poblaciones de, linfocitos T CD8+ naïve (CD8+ CD45RA+ CCR7+ CD27+); linfocitos T CD8+ de memoria central (CD8+ CD45RA- CCR7+ CD27+); linfocitos T CD8+ memoria efectores RA- (CD8+ CD45RA- CCR7- CD27-); linfocitos T CD8+ memoria efectores RA+ (CD8+ CD45RA+ CCR7- CD27-). Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). Se usó la prueba de tendencia de Cuzick para determinar la significación estadística que se estableció en $p < 0,003$ debido a las comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

3. Eliminación de linfocitos B tras tratamiento con RTX

Rituximab es un tratamiento efectivo para la eliminación de los linfocitos B CD20+. Las diferencias encontradas en los diferentes estudios publicados hasta la fecha sobre su eficacia para eliminar células B, son debidas al umbral que selecciona cada autor para definir eliminación, y al uso o no de análisis de alta sensibilidad, en el que la adquisición de un número muy elevado de eventos permite la detección de proporciones muy bajas de células CD20+, tal y como ocurre en la detección de la enfermedad mínima residual para el seguimiento de las hemopatías malignas^{135, 136, 137}.

En nuestro caso, la eliminación de los linfocitos B se definió cuando el total de células B en SP era inferior a 5 células B/ μ L. La eficacia de la eliminación de las células B CD20+ se valoró en la visita de 3 meses en 58 de los ciclos. En esta población de estudio se objetivó que en 3 pacientes se seguían detectando más de 5 células B/ μ L, que correspondían a porcentajes de

0.8%, 0.5% y 1.5% de células B entre los linfocitos totales. Esto representaba un 5% de los 58 ciclos. Dos de estos pacientes correspondían a ciclos sucesivos (4º y 9º ciclo) y el tercero era un paciente que recibió por primera vez el tratamiento, lo que representa un 4% de fracaso del fármaco en la eliminación completa de linfocitos B en los ciclos sucesivos y un 8% en los naïve, sin que las diferencias fueran estadísticamente significativas (Figura 11A; $p=0,196$). Por otra parte, uno de los casos sin eliminación completa de linfocitos B ocurrió tras un ciclo de 2000 mg RTX, lo que supone un 3% de los ciclos de 2000 mg, y en los otros dos pacientes después de un ciclo de 1000 mg RTX, lo que supone un 14% de los pacientes que habían recibido 1000 mg, aunque las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas (Figura 11B; $p=0,531$). Considerando ambas circunstancias, la desaparición de células B de SP no fue completa en un paciente naïve que recibió un ciclo de 2 g ni en dos pacientes en ciclos sucesivos de 1 g.

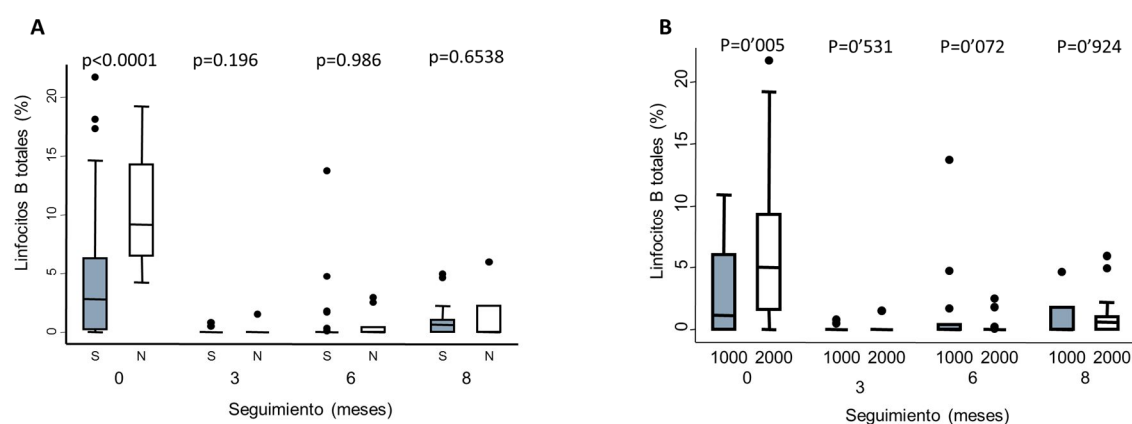


Figura 11: Comparación del porcentaje de linfocitos B al inicio del tratamiento y durante la repoblación de células B (3, 6 y 8 meses), A) entre pacientes sin tratamiento previo (N) y que han recibido ciclos sucesivos (S) con rituximab y B) entre pacientes tratados con 1000mg de RTX y 2000mg de RTX. En ambos casos los datos representan el porcentaje respecto de los linfocitos totales y se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). Se utilizó la prueba t de Student para determinar el nivel de significación.

4. Cinética de la repoblación de linfocitos B tras tratamiento con RTX

La tasa de repoblación de linfocitos B fue heterogénea: a los 6 meses se consiguió en el 20,8% de los casos mientras que en el 55% de los pacientes la repoblación de dichas células tuvo lugar a los 8 meses, en el 80% a los 10 meses y en la práctica totalidad de los pacientes a los 12 meses. No hubo diferencias significativas en la tasa de repoblación entre ciclos naïve y ciclos sucesivos (Figura 11A, $p=0.6538$) ni con respecto a la dosis de RTX administrada (Figura 11B, $p=0.924$).

5. Diferencias en las subpoblaciones de linfocitos B y T de sangre periférica entre pacientes naïve y pacientes sucesivos

5.1. Subpoblaciones de linfocitos B:

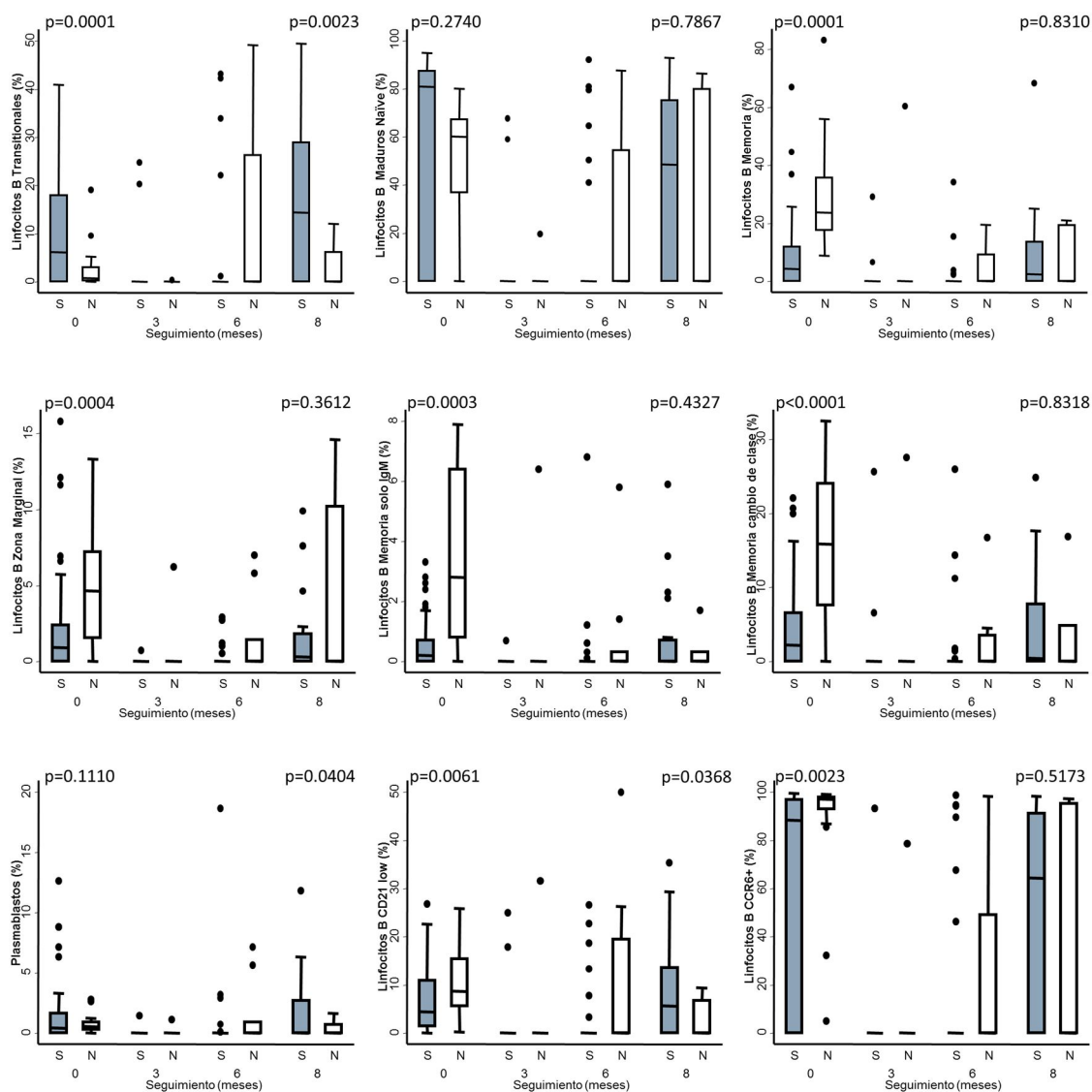
Como era previsible, los pacientes que habían recibido uno o varios ciclos previos de RTX tenían, a T0, porcentajes de linfocitos B totales significativamente más bajos que los pacientes sin tratamiento previo ($p < 0.0001$, figura 11A; tiempo=0).

Con respecto al porcentaje de subpoblaciones de linfocitos B definidas en función de su historia de exposición antigénica, a T0, los pacientes en ciclos naïve mostraron porcentajes más altos de células B de memoria ($p = 0.0001$; paneles derecho de la primera fila en la figura 12; tiempo=0), así como de sus correspondientes subtipos: linfocitos B de la zona marginal, linfocitos B con cambio de clase y linfocitos B solo IgM ($p = 0.0004$, $p < 0.0001$ y $p = 0.0003$ respectivamente; segunda fila de paneles en la figura 12; tiempo=0). Por el contrario, la proporción de los linfocitos B transicionales era más baja ($p = 0.0001$; paneles izquierdo de la primera fila en la figura 12; tiempo=0) en los pacientes sin tratamiento previo. Finalmente, la administración de ciclos anteriores de RTX no provoca un cambio en la proporción de linfocitos B naïve (panel central de la primera fila en la figura 12; tiempo=0) ni en la de plasmablastos (panel izquierdo de la tercera fila en la figura 12; tiempo=0) con respecto a los pacientes naïve.

En cuanto a otras subpoblaciones de linfocitos B con posible papel patogénico en AR, se observó que los pacientes que habían recibido RTX previamente presentaban un menor porcentaje de linfocitos B CD21low próximo a la significación estadística ($p = 0.0061$; panel central de la tercera fila en la figura 12; tiempo=0), así como una menor proporción de linfocitos B CCR6+ en sangre periférica, estadísticamente significativa ($p = 0.0023$; panel izquierdo de la tercera fila en la figura 12; tiempo=0).

Las comparaciones de las subpoblaciones de linfocitos B no se pudieron realizar a T3 y T6 debido a la escasez de pacientes que no habían eliminado o que ya habían recuperado los linfocitos B a dichos tiempos. Sin embargo, en la visita de 8 meses, cuando la repoblación de los linfocitos B ha tenido lugar en el 80% de los pacientes, no observamos diferencias significativas en ninguna de las subpoblaciones de linfocitos B, excepto por un porcentaje ligeramente menor de linfocitos B transicionales en pacientes en su primer ciclo de RTX, que probablemente no sea relevante clínicamente ya que, al sexto mes, el porcentaje de dichos linfocitos fue mayor en esos mismos pacientes (figura 11A y panel izquierdo de la primera fila de la figura 12; tiempo=8).

En resumen, los pacientes que han recibido ciclos anteriores de RTX presentan una menor proporción de linfocitos B de memoria y mayores porcentajes de linfocitos B transicionales en la visita basal y, en el mes 8 postratamiento, no se detectan diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes.



5.2. Subpoblaciones de linfocitos T:

Dado que las subpoblaciones de linfocitos T estudiadas son superiores en número a las de LB y que, en principio, no hay una eliminación de este subtipo celular, los datos se mostrarán de una forma más compartimentada: poblaciones globales (LT, CD4 y CD8 totales), subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 en función de su historia de exposición antigénica (naïve, memoria central, memoria efectores RA+ y memoria efectores RA-) y subpoblaciones específicas de células T CD4 (linfocitos CD4+ CD25++, linfocitos T CD4+ foliculares, linfocitos T CD4+CCR6+ y linfocitos T CD4+CCR6+CXCR6+).

En una primera aproximación, se analizó el comportamiento de los linfocitos T en todos los pacientes, con independencia de si habían recibido RTX previamente o no, para determinar si hay cambios en relación con la eliminación y posterior repoblación de células B durante un ciclo de tratamiento, para después comparar las subpoblaciones de linfocitos T en los pacientes correspondientes a ciclos naïve y sucesivos. Así, pudimos comprobar que un ciclo de tratamiento con RTX no induce cambios ni en el porcentaje de linfocitos T totales en SP ni en el de las subpoblaciones de los linfocitos T CD4+ o T CD8+ (figura 13).

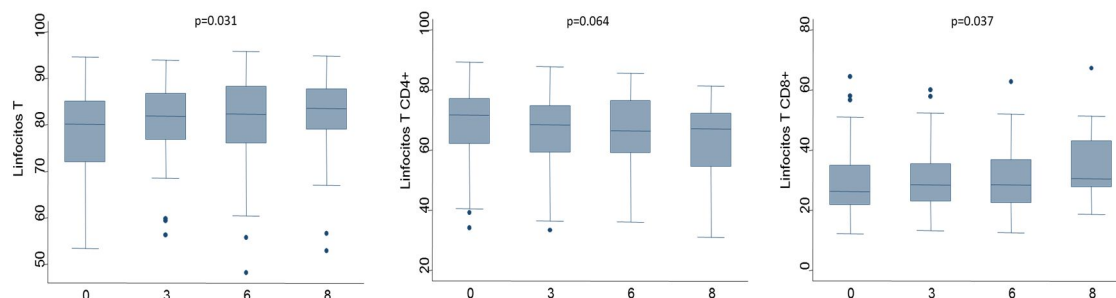


Figura 13: Evolución de las subpoblaciones de linfocitos T en las visitas inicial, y las visitas 3, 6, 8 meses en pacientes en tratamiento con rituximab. Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos totales en la gráfica de la primera fila, y el porcentaje con respecto a los linfocitos T en todas las demás gráficas. Se muestran las poblaciones de linfocitos T totales y de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0,003$ debido a comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ clasificadas en función de su historia de exposición antigénica, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de estas células a lo largo del ciclo, por lo que puede deducirse que las poblaciones de linfocitos T CD4+ naïve, de memoria central, de memoria efectores RA- y de memoria efectores RA+, permanecen estables a lo largo de un ciclo de RTX (figura 14).

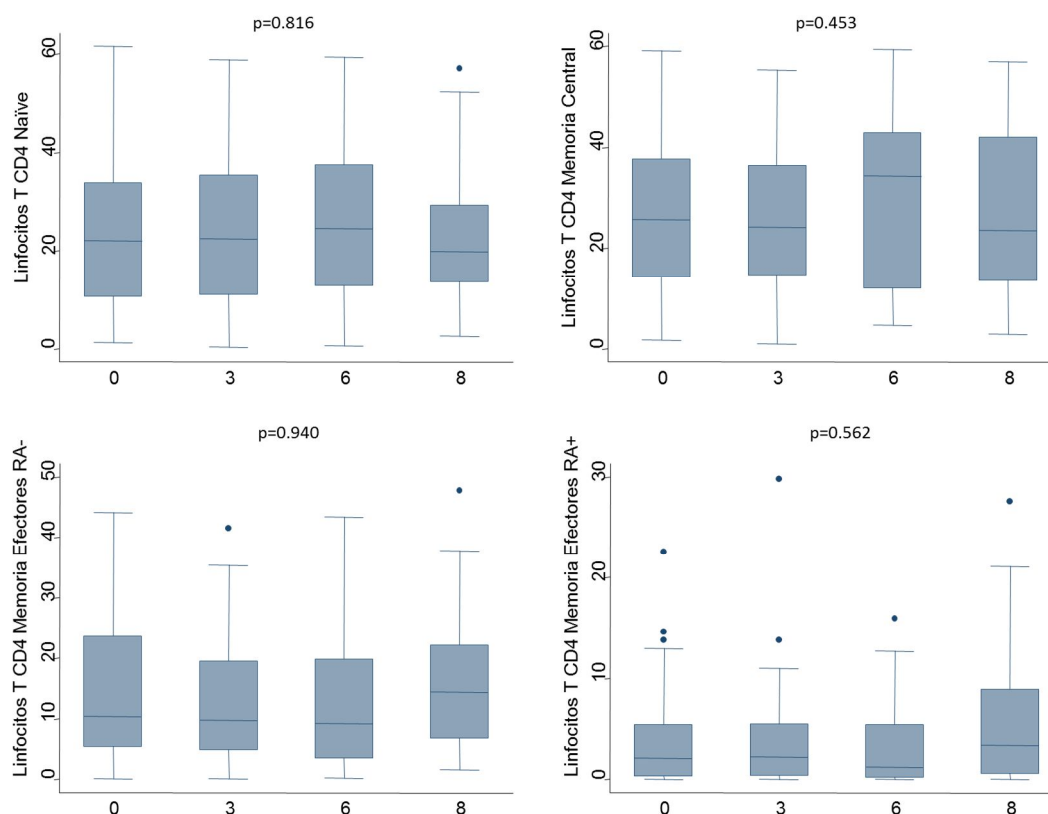


Figura 14: Evolución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ definidas por la exposición a antígeno, en las visitas inicial y visitas a 3, 6, 8 meses en pacientes en tratamiento con rituximab. Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T CD4+ en todas las gráficas. Se muestran las poblaciones de linfocitos T CD4+ naïve (CD4+ CD45RA+ CCR7+ CD27+); linfocitos T CD4+ de memoria central (CD4+ CD45RA- CCR7+ CD27+); linfocitos T CD4+ memoria efectores RA- (CD4+ CD45RA- CCR7- CD27-); linfocitos T CD4+ memoria efectores RA+ (CD4+ CD45RA+ CCR7- CD27-). Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0,003$ debido a comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

Con respecto a las poblaciones específicas de linfocitos T CD4+ estudiadas, las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ CD25++ y las de linfocitos T CD4+ CXCR6+ CCR6+ no experimentaron variación en su porcentaje en el periodo de ocho meses desde la infusión de RTX (figura 15, panel izquierdo de la primera fila y panel izquierdo de la segunda fila). Sin embargo, las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ foliculares y de linfocitos T CD4+CCR6+ tendían a disminuir en los meses sucesivos a la infusión ($p=0.012$ y $p=0.030$ respectivamente; panel derecho, primera fila y panel derecho, segunda fila; figura 15).

Resultados

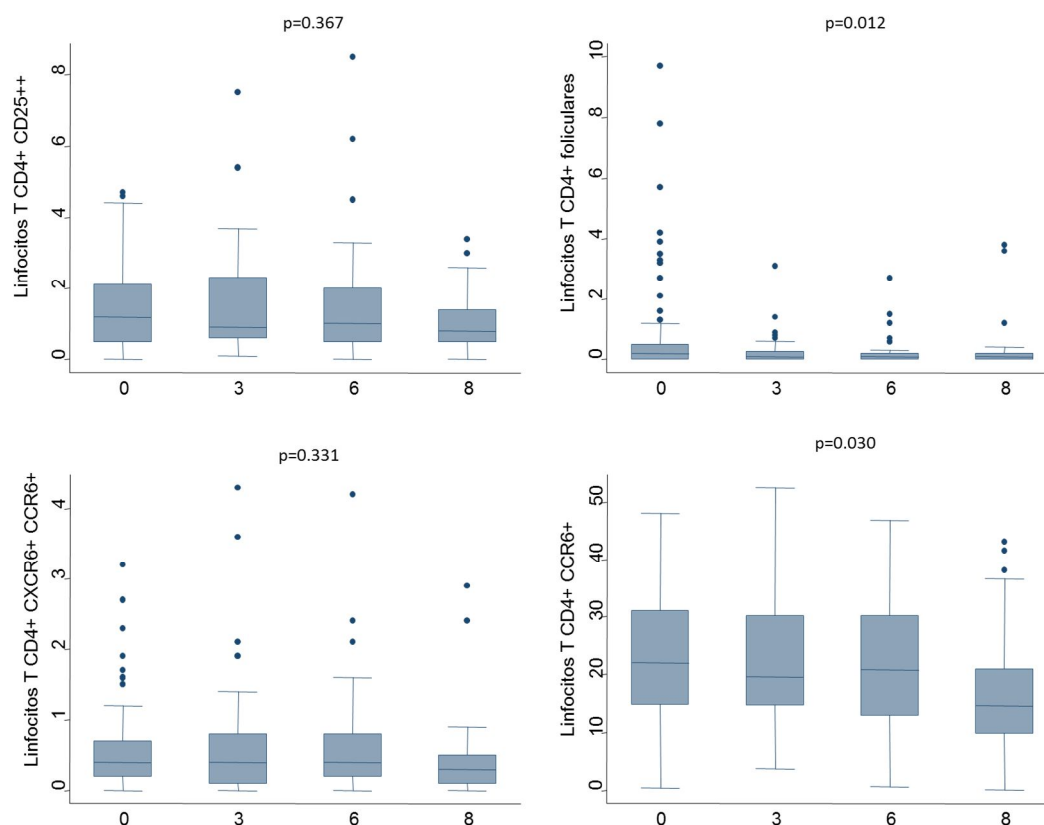


Figura 15: Evolución de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con posible papel patogénico en AR, en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses en pacientes tratamiento con rituximab. Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T CD4+ en todas las gráficas. Se muestran las poblaciones de linfocitos T CD4+ CD25+; linfocitos T CD4+ foliculares (CD4+ PD1+ CXCR5+); linfocitos T CD4+ CXCR6+ CCR6+; linfocitos T CD4+ CCR6+. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0,003$ debido a comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

De forma similar a lo que sucedía con las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, la eliminación de linfocitos B por RTX y su posterior repoblación no generan cambios en las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ naïve, linfocitos T CD8+ de memoria central, linfocitos T CD8+ memoria efectores RA- ni en los linfocitos T CD8+ memoria efectores RA+ (figura 16).

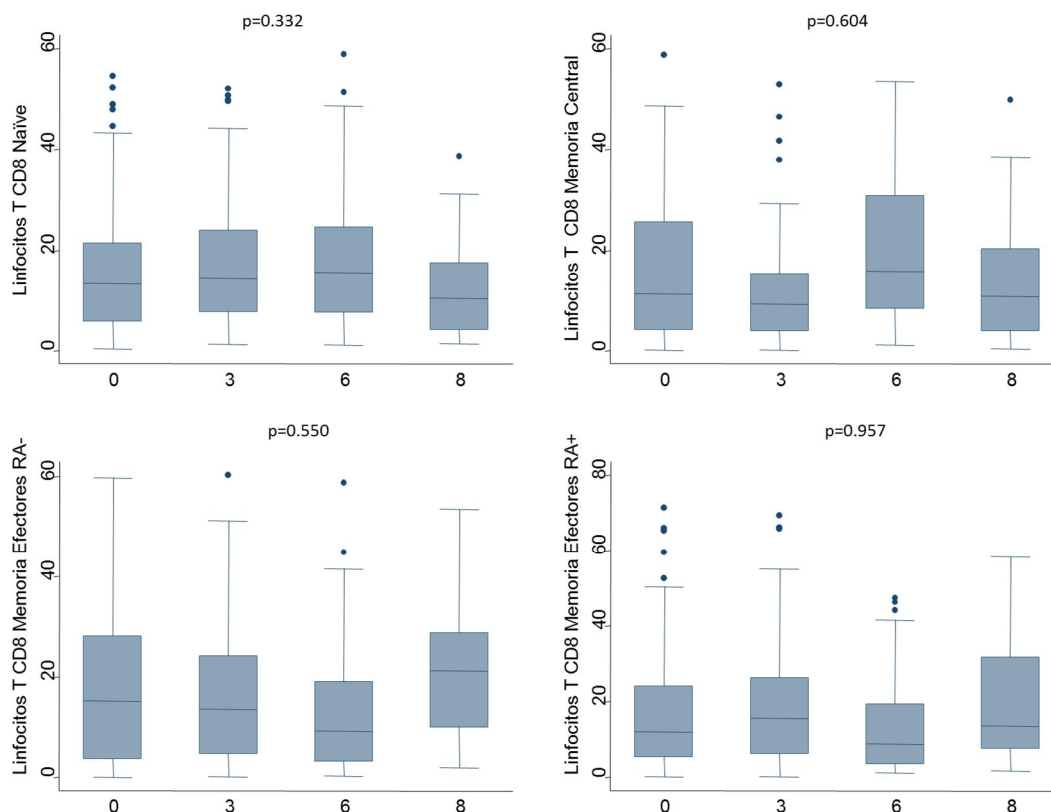


Figura 16: Evolución de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses en pacientes tratamiento con rituximab. Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T CD8+ en todas las gráficas. Se muestran las poblaciones de linfocitos T CD8+ naïve (CD8+ CD45RA+ CCR7+ CD27+); linfocitos T CD8+ de memoria central (CD8+ CD45RA- CCR7+ CD27+); linfocitos T CD8+ memoria efectores RA- (CD8+ CD45RA- CCR7- CD27-); linfocitos T CD8+ memoria efectores RA+ (CD8+ CD45RA+ CCR7- CD27-). Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0,003$ debido a comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

Posteriormente, para determinar si el tratamiento con RTX provoca algún cambio en la proporción de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, comparamos los porcentajes de dichas poblaciones entre los pacientes naïve y los pacientes que habían recibido al menos un ciclo de RTX a T0. Además, se estudió si había diferencias significativas en las subpoblaciones de linfocitos T en las visitas sucesivas entre los mismos grupos de pacientes.

Como se observa en la figura 17, no se encontraron diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD4+ ni CD8+ entre los pacientes que recibían su primer ciclo con RTX respecto a los pacientes que sí lo habían recibido (figura 17; tiempo=0). Tampoco se observaron tendencias a un cambio a lo largo de los ciclos en estas poblaciones, ni en los ciclos naïve, ni en los sucesivos.

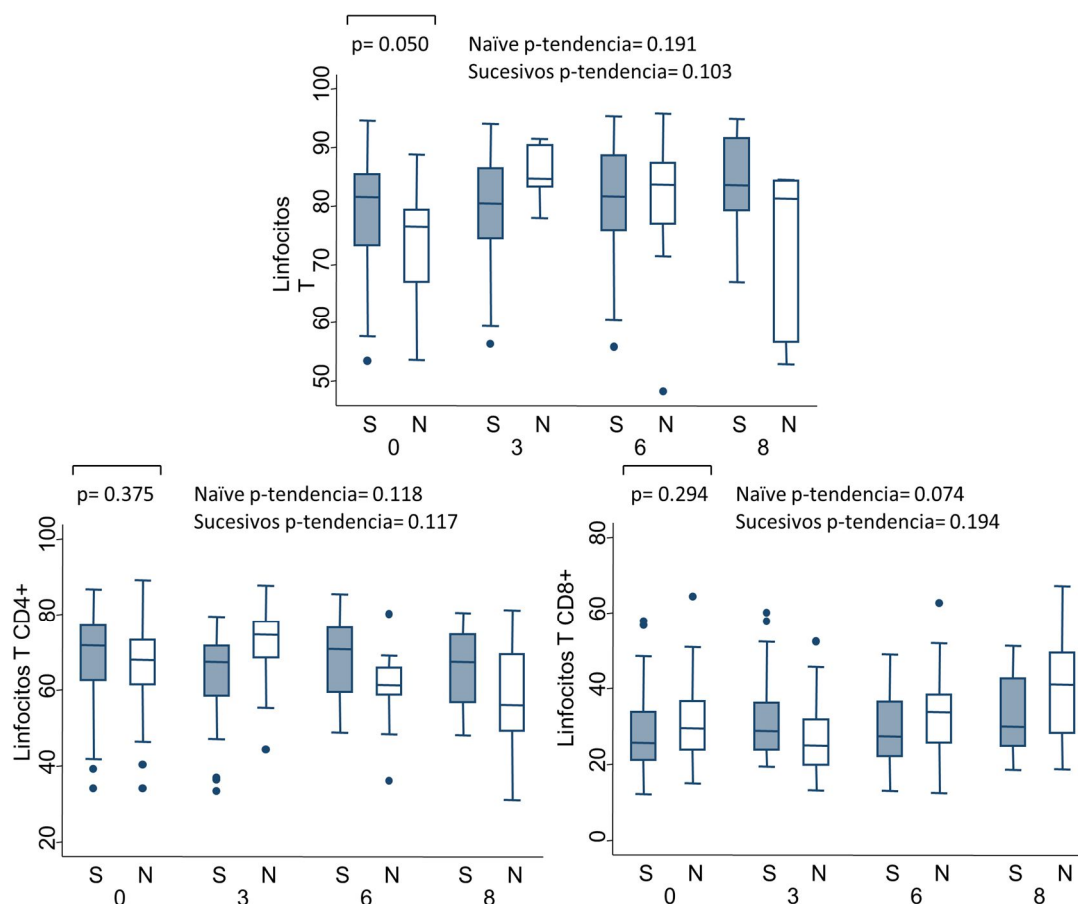


Figura 17: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) que han recibido tratamiento con rituximab. Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos totales en la gráfica de la primera fila, y el porcentaje con respecto a los linfocitos T en todas las demás gráficas. Se muestran las poblaciones de linfocitos T totales, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0,003$ debido a comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

De forma similar, en la visita T0, las proporciones de las distintas subpoblaciones naïve, memoria y efectoras de linfocitos T CD4+ o T CD8+ no se vieron afectadas significativamente por la administración previa de al menos un ciclo de tratamiento (figura 18 y 19, filas primera y segunda; tiempo=0), ni a lo largo del seguimiento.

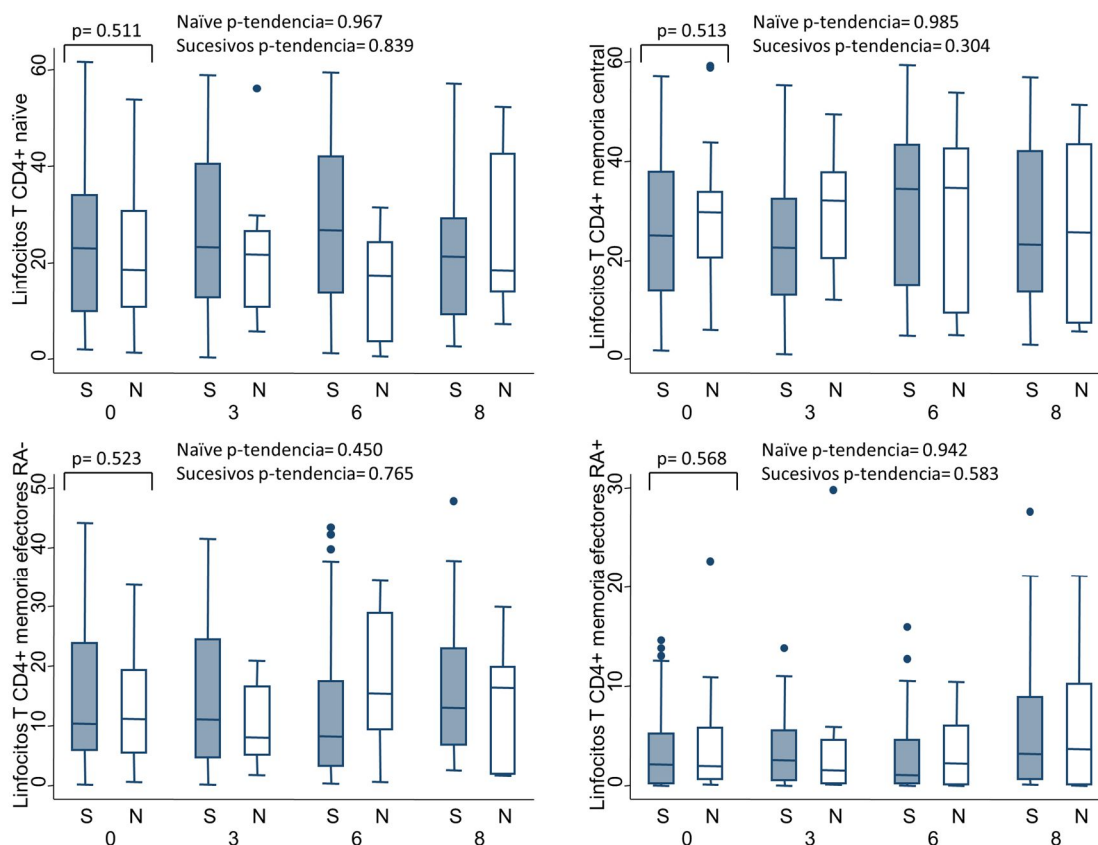


Figura 18: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ definidas por la exposición a antígeno, en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) en tratamiento con rituximab. Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T CD4+. Se muestran las poblaciones de linfocitos T CD4+ naïve (CD4+ CD45RA+ CCR7+ CD27+); linfocitos T CD4+ de memoria central (CD4+ CD45RA- CCR7+ CD27+); linfocitos T CD4+ memoria efectores RA- (CD4+ CD45RA- CCR7- CD27-); linfocitos T CD4+ memoria efectores RA+ (CD4+ CD45RA+ CCR7- CD27-). Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0,003$ debido a comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

Resultados

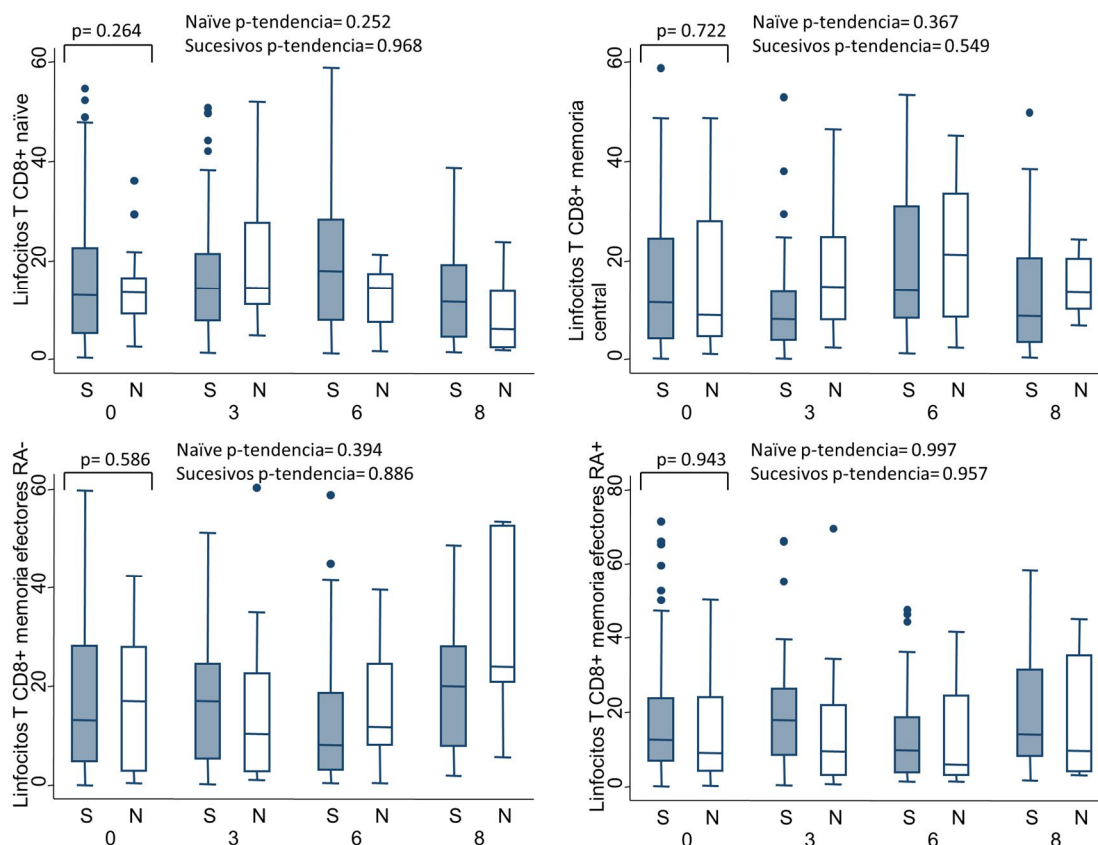


Figura 19: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) en tratamiento con rituximab. Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T CD8+. Se muestran las poblaciones de linfocitos T CD8+ naïve (CD8+ CD45RA+ CCR7+ CD27+); linfocitos T CD8+ de memoria central (CD8+ CD45RA- CCR7+ CD27+); linfocitos T CD8+ memoria efectores RA- (CD8+ CD45RA- CCR7- CD27-); linfocitos T CD8+ memoria efectores RA+ (CD8+ CD45RA+ CCR7- CD27-). Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0,003$ debido a comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

En lo que respecta a los linfocitos T CD4+ foliculares (CD4+ PD1+ CXCR5+), no se detectaron diferencias significativas entre pacientes naïve a rituximab y los que recibieron ciclos sucesivos en la visita basal (Figura 20 panel superior derecho, tiempo 0). Sin embargo, se observó una tendencia a la disminución a lo largo de las visitas tras la infusión de rituximab tanto en pacientes naïve como en sucesivos ($p=0.041$ y $p=0.058$ respectivamente). Los linfocitos CD4+ CD25++ no experimentaron variación en su porcentaje entre los dos grupos de estudio, ni a lo largo del seguimiento (figura 20, panel superior izquierdo).

Por el contrario, de forma interesante, los pacientes que nunca habían recibido tratamiento con RTX tenían en SP proporciones significativamente mayores de las subpoblaciones T CD4+ CCR6+ y T CD4+ CXCR6+ CCR6+ que los pacientes que habían sido tratados con dicho anticuerpo (figura 20, paneles inferiores; tiempo=0; $p=0.002$ y $p<0.001$).

respectivamente). Además, en los pacientes naïve, los linfocitos T CD4+ CXCR6+ CCR6+y T CD4+ CCR6+ fueron disminuyendo a lo largo del ciclo (Figura 20, paneles inferiores; cajas blancas; $p=0.004$ y $p=0.078$, respectivamente), de forma que la diferencia observada entre pacientes naïve y sucesivos a T0 dejó de observarse en las visitas posteriores (figura 20, paneles inferiores). Por su parte, estas mismas poblaciones no disminuyeron a lo largo del ciclo en los pacientes sucesivos (figura 20, paneles inferiores; cajas azules).

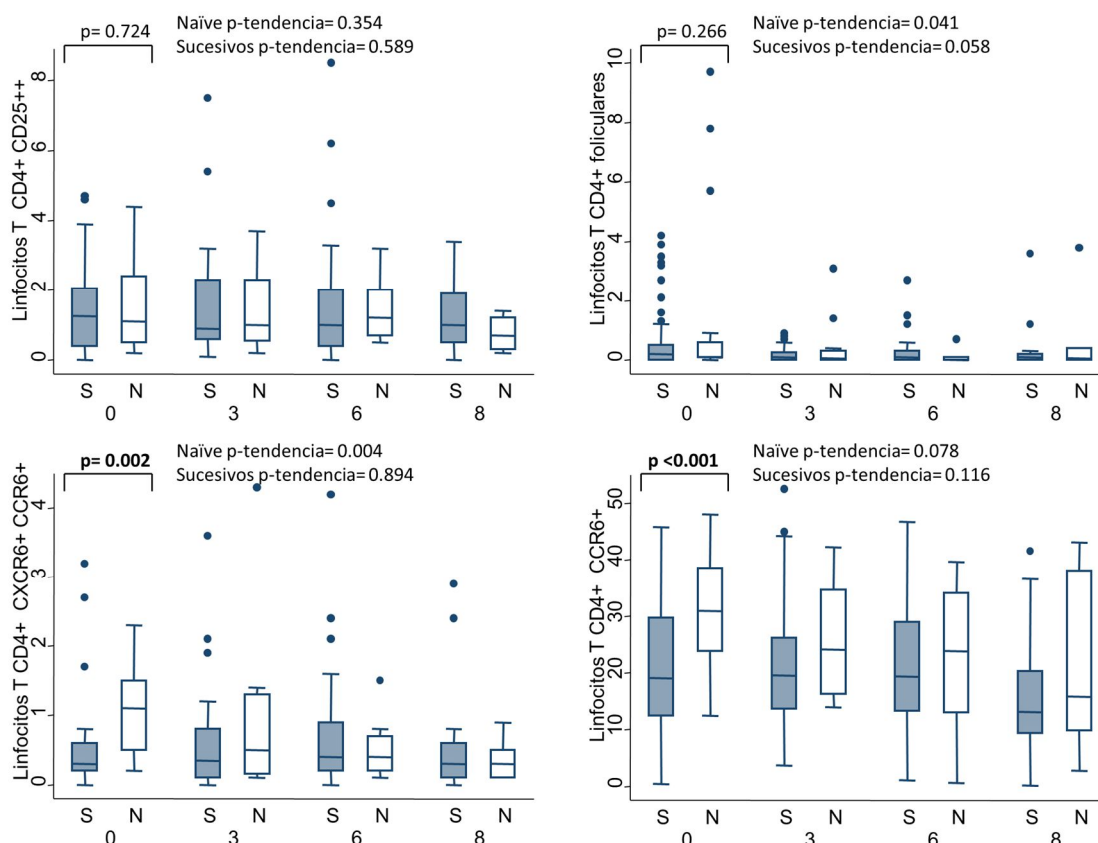


Figura 20: Comparación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con posible papel patogénico en AR, en la visita inicial y a los 3, 6, 8 meses entre pacientes naïve (N) y sucesivos (S) en tratamiento con rituximab. Los datos representan el porcentaje con respecto a los linfocitos T CD4+ en todas las gráficas. Se muestran las poblaciones de linfocitos T CD4+ CD25++; linfocitos T CD4+ foliculares (CD4+ PD1+ CXCR5+); linfocitos T CD4+ CXCR6+ CCR6+; linfocitos T CD4+ CCR6+. Los datos se muestran como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0.003$ debido a comparaciones múltiples, de acuerdo con la corrección de Bonferroni.

En resumen, en la visita basal, los pacientes naïve para RTX presentan una mayor proporción de linfocitos T CD4+ CCR6+ y CD4+ CXCR6+CCR6+ que los que ya han recibido RTX previamente. Además, se detecta una disminución significativa de los linfocitos CD4+ CXCR6+CCR6+ a lo largo del seguimiento del primer ciclo de rituximab de

los pacientes naïve. También se observa una tendencia no significativa a que los linfocitos T foliculares disminuyan a lo largo del seguimiento tanto de los pacientes naïve como sucesivos.

6. Asociación de la actividad de la enfermedad y las subpoblaciones linfocitarias

La actividad de la enfermedad se evaluó mediante el índice DAS28 en la visita inicial de todos los pacientes del estudio y se comparó entre los grupos naïve y sucesivos. Como puede observarse en la figura 21, los pacientes que no habían recibido ningún ciclo de RTX presentaban mayor actividad de la enfermedad que los pacientes tratados previamente con el anticuerpo ($p=0.021$; figura 21). Dado que hubo diferencias significativas en varias subpoblaciones de linfocitos B y T a T0 entre pacientes naïve y con ciclos sucesivos, estudiamos si había alguna asociación a T0 entre las subpoblaciones de linfocitos analizadas y la actividad de la enfermedad.

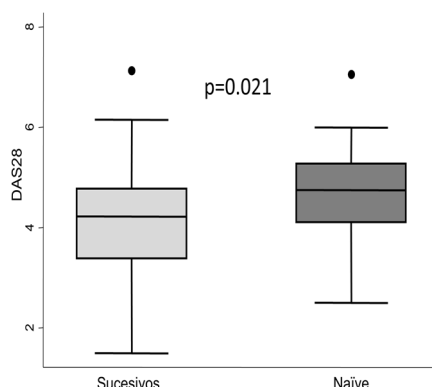


Figura 21: Actividad inicial de la enfermedad en la visita T0 de pacientes que iban a recibir su primer ciclo de rituximab (Naïve; cuadros de color gris oscuro) y pacientes con al menos un ciclo previo (Sucesivos; cuadros de color gris claro) de dicho fármaco. Se muestran los datos como rango intercuartílico (borde superior p75, borde inferior p25, línea media p50), p95 (línea sobre la caja) y p5 (línea debajo de la caja) de DAS28. Los puntos representan valores atípicos. El análisis estadístico utilizado fue la prueba t de Student. El umbral de significación se estableció en $p < 0.05$.

6.1. Subpoblaciones de linfocitos B:

El porcentaje de linfocitos B transicionales en el grupo sin tratamiento previo con RTX era significativamente mayor en aquellos pacientes con niveles elevados de actividad de la enfermedad a T0 ($p=0.003$; figura 22, primer panel de la segunda fila). Además, hubo una tendencia no significativa similar en pacientes que ya habían recibido algún ciclo de RTX. Ninguna de las otras subpoblaciones analizadas mostró asociación con la actividad de la enfermedad a T0 (figura 22).

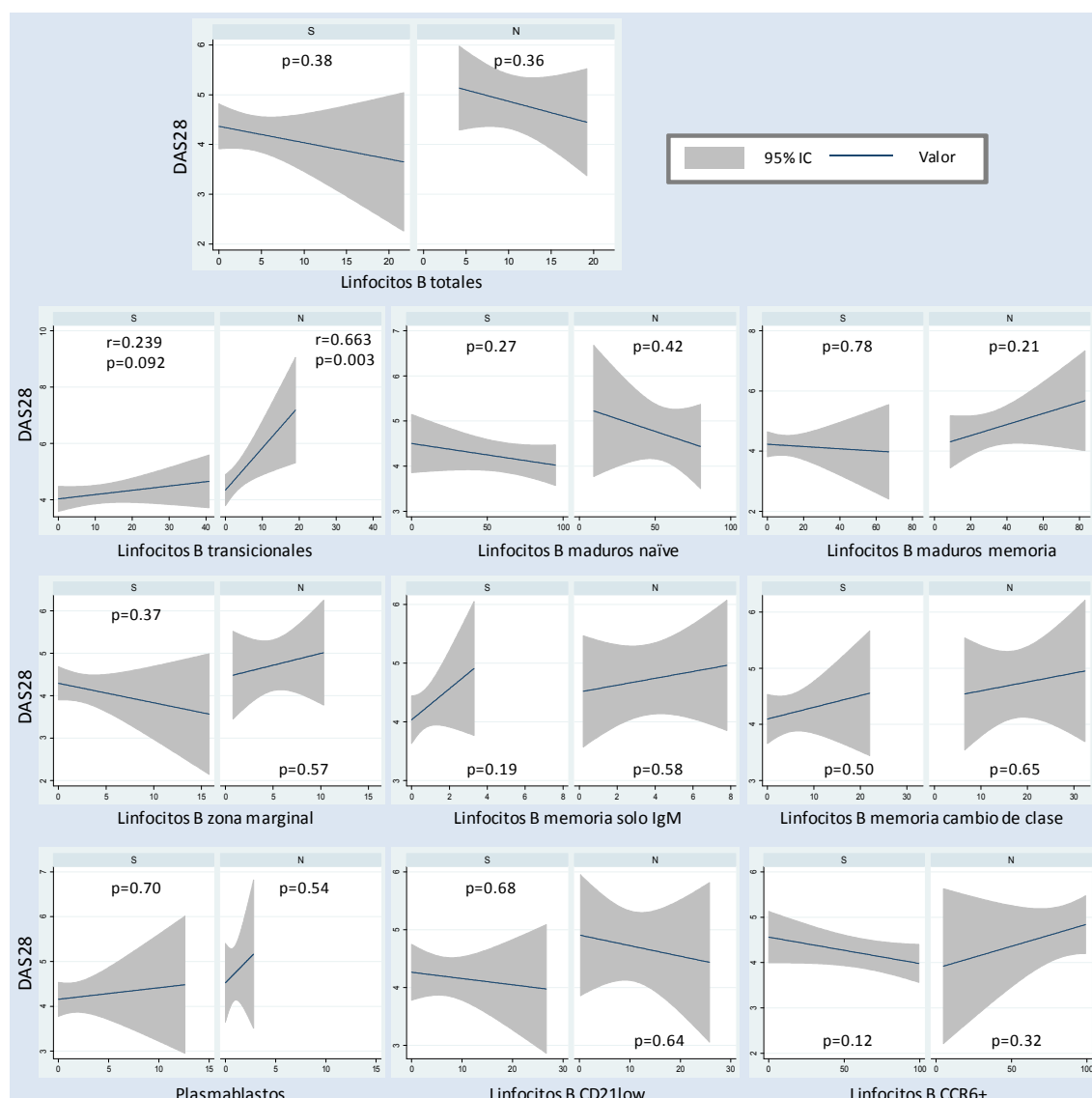


Figura 22: Correlación entre el porcentaje de linfocitos B y sus subpoblaciones con la actividad de la enfermedad de la artritis reumatoide, evaluada con DAS28. Los datos se muestran como las correlaciones lineales (línea continua) y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (áreas grises) para ciclos sucesivos (panel izquierdo) y ciclos naïve (panel derecho). El coeficiente p y el p -valor se estimaron con la prueba de Pearson y la significación estadística se ajustaron a nivel $p < 0.005$ debido a comparaciones múltiples.

6.2. Subpoblaciones de linfocitos T:

A pesar de que ninguna de las subpoblaciones de linfocitos T estudiadas mostró una asociación estadísticamente significativa con la actividad de la enfermedad, algunas subpoblaciones mostraron una tendencia a la significación o mostraron un comportamiento congruente con los datos mostrados previamente (figuras 23, 24, 25 y 26).

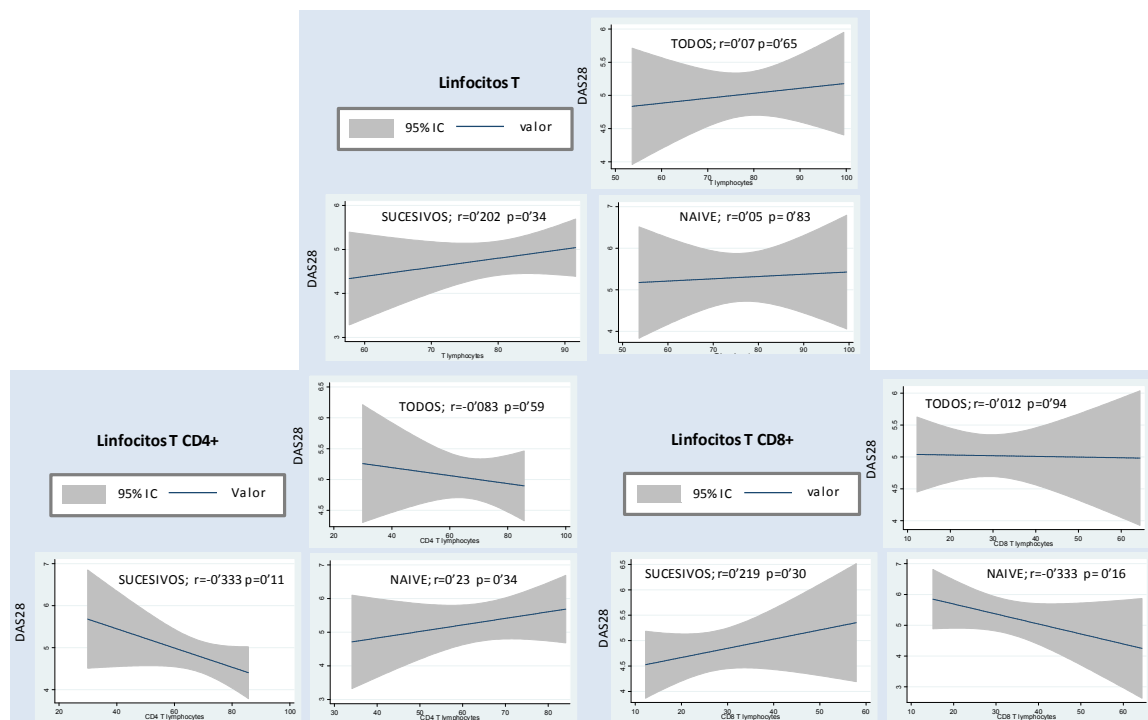


Figura 23: Correlación entre el porcentaje de linfocitos T y sus subpoblaciones con la actividad de la enfermedad, evaluada con DAS28. Los datos se muestran como las correlaciones lineales (línea continua) y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (áreas grises) para el total de los pacientes (panel superior junta a leyenda), ciclos sucesivos (panel inferior izquierdo) y ciclos naïve (panel inferior derecho) de las poblaciones de linfocitos T totales, Linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. El coeficiente p y el p -valor se estimaron con la prueba de Pearson y la significación estadística se ajustaron a nivel $p<0.003$ debido a comparaciones múltiples.

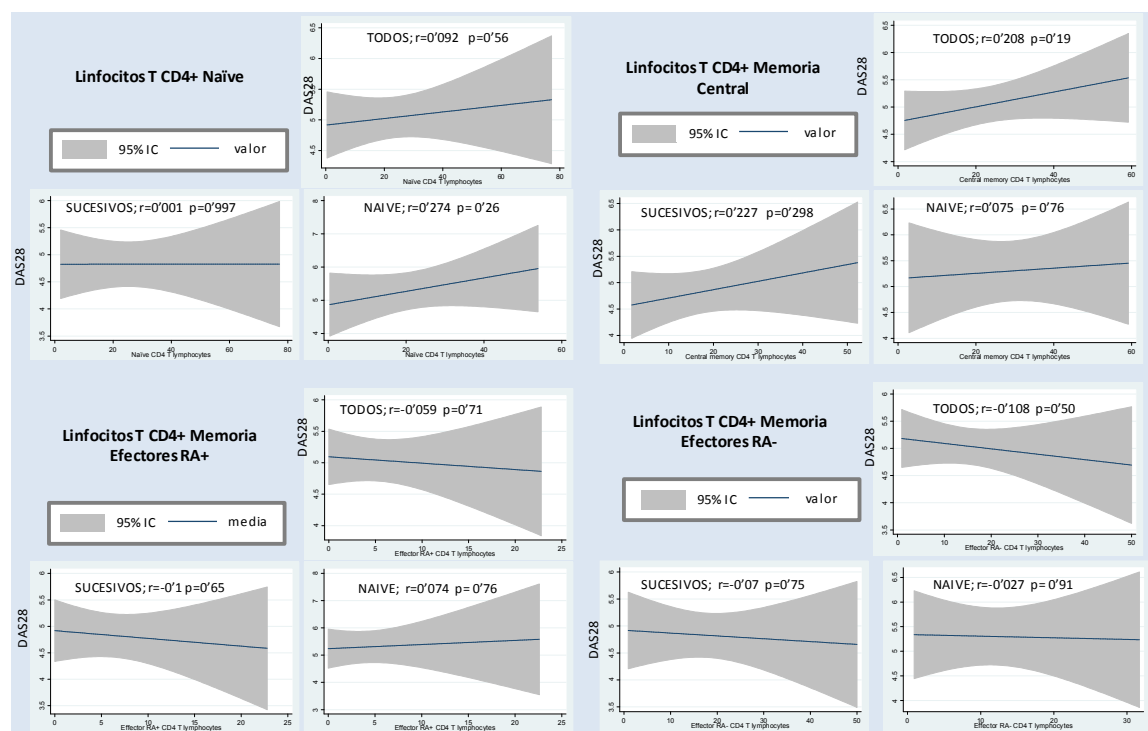
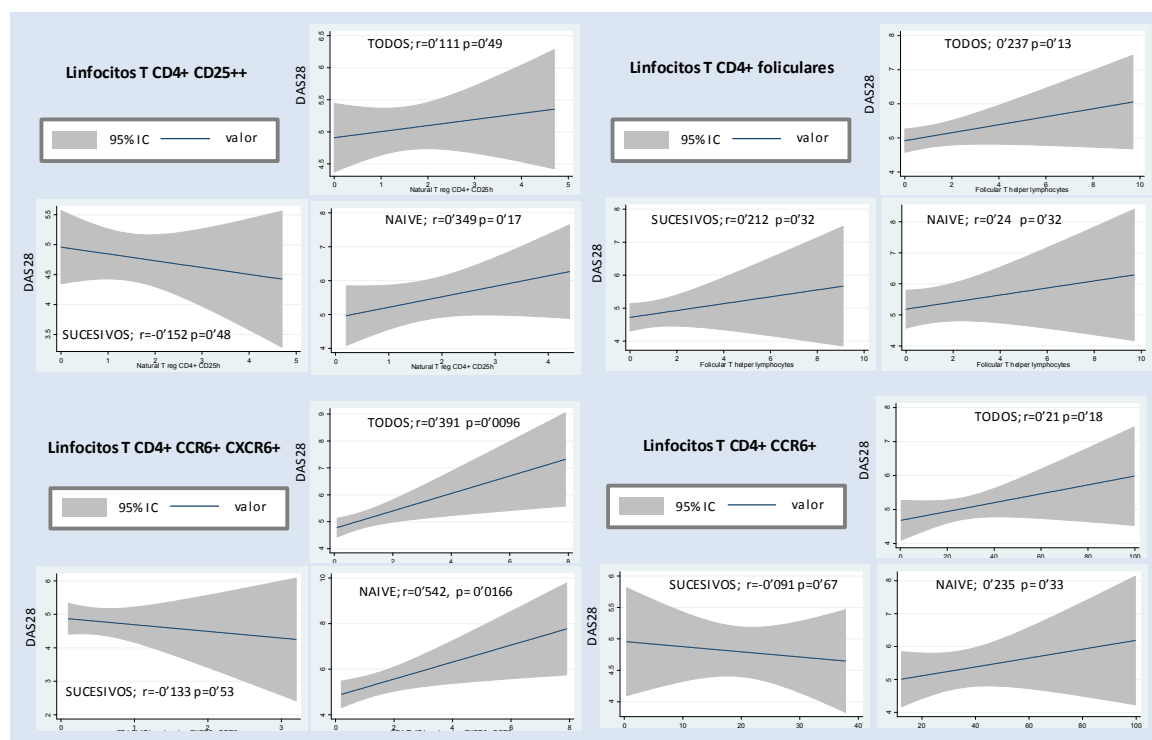


Figura 24: Correlación entre el porcentaje subpoblaciones de linfocitos T CD4+ definidas por la exposición antígeno, con la actividad de la enfermedad, evaluada con DAS28. Los datos se muestran como las correlaciones lineales (línea continua) y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (áreas grises) para el total de los pacientes (panel superior junta a leyenda), ciclos sucesivos (panel inferior izquierdo) y ciclos naïve (panel inferior derecho) de las poblaciones de linfocitos T CD4+ naïve; linfocitos T CD4+ de memoria central; linfocitos T CD4+ memoria efectores RA-; linfocitos T CD4+ memoria efectores RA+. El coeficiente p y el p -valor se estimaron con la prueba de Pearson y la significación estadística se ajustaron a nivel $p<0.003$ debido a comparaciones múltiples.

El porcentaje linfocitos CD4 foliculares, de forma consistente, aunque no significativa, era más elevado en los pacientes con mayor actividad, independientemente de si el paciente era naïve para rituximab o sucesivo. Este hallazgo es congruente con que esta población esté más representada a T0, tanto en ciclos naïve como sucesivos y tras la administración de rituximab vaya disminuyendo.

Por otra parte, el hallazgo más relevante fue que en los pacientes que nunca habían recibido previamente rituximab, el porcentaje de linfocitos T CD4+ CCR6+ CXCR6+ en SP era más alto en los pacientes con mayor nivel de actividad de la enfermedad según el DAS28, ($p=0.0166$; panel izquierdo, 4ª fila, figura X). Como se ha descrito previamente, esta subpoblación estaba elevada a tiempo 0 en pacientes naïve y disminuía a lo largo del primer ciclo para no volver a recuperarse en los ciclos de pacientes sucesivos.



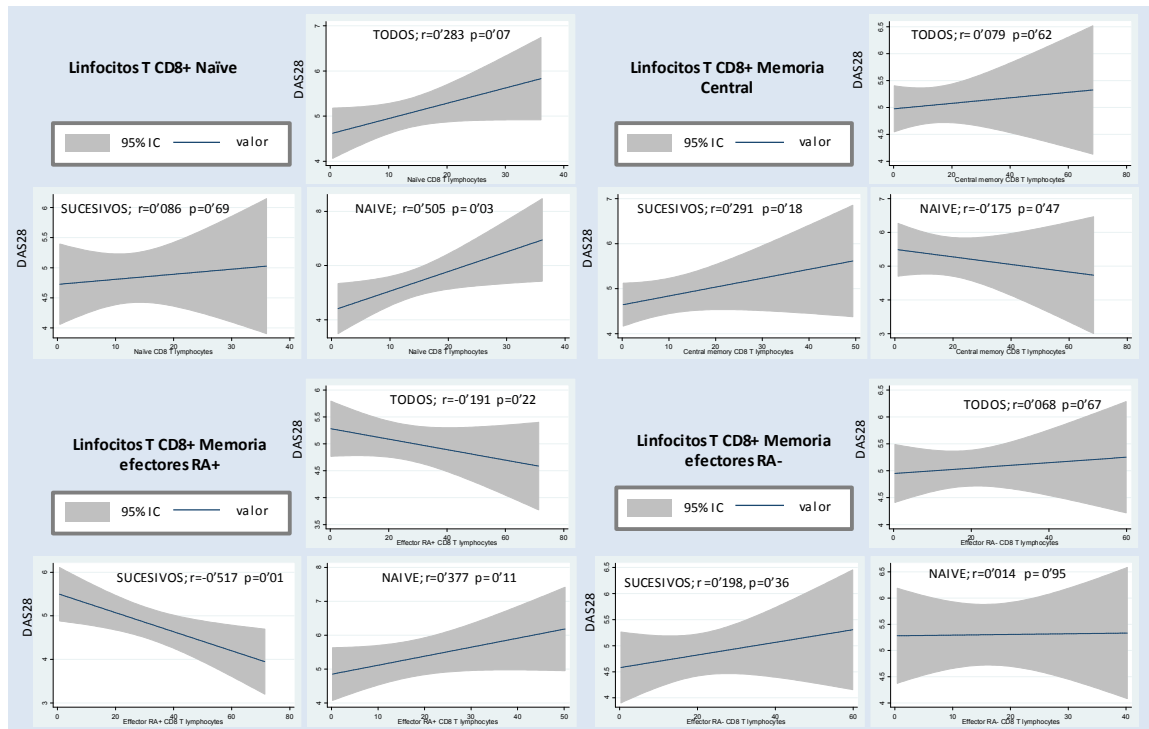


Figura 26: Correlación entre el porcentaje de algunas subpoblaciones de linfocitos TCD8+ con la actividad de la enfermedad, evaluada con DAS28. Los datos se muestran como las correlaciones lineales (línea continua) y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (áreas grises) para el total de los pacientes (panel superior junto a leyenda), ciclos sucesivos (panel inferior izquierdo) y ciclos naïve (panel inferior derecho) de poblaciones de linfocitos T CD8+ naïve; linfocitos T CD8+ de memoria central; linfocitos T CD8+ memoria efectores RA-; linfocitos T CD8+ memoria efectores RA+. El coeficiente r y el p -valor se estimaron con la prueba de Pearson y la significación estadística se ajustaron a nivel $p < 0.003$ debido a comparaciones múltiples.

DISCUSIÓN

Rituximab (RTX) es un anticuerpo anti-CD20 que, por su actividad citotóxica, fue desarrollado para el tratamiento de linfomas de células B. Posteriormente, se comprobó que la eliminación de linfocitos B con RTX y otros anticuerpos anti-CD20 es eficaz en el tratamiento de pacientes con AR¹³⁸ y otras enfermedades autoinmunes, como la esclerosis múltiple, vasculitis asociada a ANCA^{139, 140} o púrpura trombocitopénica idiopática¹⁴¹. Este hecho pone de manifiesto la relevancia de las interacciones entre diferentes estirpes celulares del SI en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. Esto ha sido especialmente notorio en la AR que se ha considerado clásicamente una enfermedad mediada por linfocitos T, al igual que está sucediendo con otras patologías autoinmunes cuya patogenia también se atribuía principalmente a la hipersensibilidad por células T como la esclerosis múltiple mencionada arriba.

El tratamiento de enfermedades autoinmunes con RTX muestra una respuesta heterogénea, con procesos que responden excepcionalmente bien como la púrpura trombocitopénica idiopática que habitualmente precisan un solo ciclo de tratamiento para resolver la enfermedad. Por el contrario, en la AR la reconstitución de los linfocitos B después de su eliminación con RTX, por lo general coincide con un nuevo brote de la enfermedad^{115, 119}. Es más, la respuesta terapéutica en la AR también es heterogénea a nivel individual, tanto en lo referido a la intensidad del efecto terapéutico como a la duración de la respuesta. Además, la relación entre la reaparición de linfocitos B en sangre periférica y la reactivación de la enfermedad varía entre individuos y aunque suele haber una asociación directa entre ambos eventos, se han descrito, de hecho, los denominados casos discordantes, en los que la repoblación de los linfocitos B no se asocia con un nuevo brote o, por el contrario, aparece un nuevo brote en ausencia de reconstitución del linaje de células B.

Por último, la pauta idónea de tratamiento con RTX en la AR es controvertida. Inicialmente, la compañía que desarrollo el producto propuso, en base a los ensayos clínicos desarrollados para la aprobación del fármaco, una pauta de tratamiento consistente en ciclos de 2 g (dos infusiones de 1 g separadas por 15 días) cada 6 meses. Sin embargo, en dichos ensayos clínicos se excluían pacientes con hipogammaglobulinemia. Posteriormente, se ha descrito que la disminución de IgG por debajo de 600 mg/dl se asocia con mayor frecuencia de complicaciones infecciosas¹⁴². Por este motivo, otras pautas de tratamiento se han ido probando en la práctica clínica diaria. En este sentido, según se ha descrito en el estudio RITAR, el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Princesa usa principalmente la pauta a demanda, consistente en la administración del nuevo tratamiento con RTX cuando la enfermedad está comenzando a reactivarse. Ello ha permitido estudiar el efecto de RTX en las diferentes

subpoblaciones de linfocitos B y T con el objetivo de conocer mejor los cambios que se producen y determinar si la monitorización de alguna subpoblación podría ser de ayuda en el manejo de este fármaco. Los pacientes a los que se realizó el estudio inmunofenotípico de subpoblaciones linfocitarias es un subconjunto del estudio RITAR, que es representativo de la población de AR tratada con RTX en el Hospital La Princesa para el control de la actividad articular.

Rituximab es un tratamiento efectivo para la eliminación de linfocitos B en pacientes con AR

Con respecto a la eficacia de la eliminación de los linfocitos B de sangre periférica, nuestro estudio confirma datos previamente descritos por otros autores^{129, 130, 131}. El 95% de los pacientes analizados consiguen una eliminación total de linfocitos B, definida como valores inferiores a 5 células B/ μ L, tras la adquisición de un mínimo de 10^6 eventos totales por CMF. Además, nuestro estudio ha permitido determinar que no existen diferencias entre la administración de ciclos de 1 ó 2 g en cuanto a la eficacia de destrucción de linfocitos B. Este dato también coincide con la información proporcionada por Vital *et al*, en el que asocian la respuesta clínica con la eficacia de la eliminación de linfocitos B de sangre periférica más que con la dosis administrada de RTX¹⁴³.

En cuanto a los casos de fracaso en la eliminación de los linfocitos B de SP, aunque sin alcanzar diferencias significativas, un 8% de los pacientes en su primer ciclo de RTX no consiguieron una supresión completa de linfocitos B, mientras que esto solo ocurrió en un 4% de los pacientes que recibían su segundo ciclo o superior. Y ello a pesar de que los pacientes naïve que no consiguieron eliminación completa recibieron ciclos de 2 g, mientras que el paciente sucesivo que no consiguió el objetivo de destrucción completa de linfocitos B recibió 1 gr. Por lo tanto, parece que la variabilidad en la capacidad de inducir muerte celular de los linfocitos B con RTX depende de factores individuales del paciente. En este sentido, se ha descrito que “*in vitro*” RTX sería menos eficaz para producir muerte celular de células CD20 positivas en pacientes con polimorfismos asociados a variantes del receptor de Fc de IgG de baja afinidad (Fc γ RIII o CD16), o incluso a ausencia de CD16, que condicionaría menor citotoxicidad dependiente de anticuerpo o ADCC por parte de las células NK y/o menor fagocitosis por parte de monocitos y neutrófilos¹⁴⁴. Así mismo, se ha sugerido que estos pacientes podrían tener una menor respuesta clínica con dosis estándar de RTX¹⁴⁵, aunque estos datos deben ser confirmados.

La repoblación de sangre periférica de linfocitos B sigue el patrón ontogénico normal

Nuestro estudio también confirma lo hallazgos previos de otros autores que indican que la reaparición de linfocitos B en sangre periférica es heterogénea y ocurre con una mediana entre los 8-9 meses tras la administración de RTX. De nuevo, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes que habían sido tratados previamente con RTX y los pacientes naïve y tampoco con respecto a la dosis de RTX administrada. Estos hallazgos apoyarían la hipótesis de que la repoblación es un hecho que sigue un patrón individual de cada paciente^{129, 130, 131}.

Como era de esperar, los pacientes tratados previamente con RTX tenían menos linfocitos B que los pacientes estudiados antes de recibir su primer ciclo. Además, en los pacientes tratados con dosis sucesivas de RTX, esos linfocitos B de sangre periférica estaban compuestos, en comparación con los pacientes nunca tratados con RTX, por un mayor porcentaje de linfocitos B transicionales y una menor proporción de células B de memoria, en concordancia con estudios similares realizados hasta la fecha^{129, 130, 132}. Esto sugiere que la repoblación de linfocitos B en SP ocurre a costa de una migración precoz de formas transicionales que van madurando progresivamente con la exposición a antígenos siguiendo la ontogenia natural de estas células. Los motivos por los que se produce esta migración precoz no están claros, pero se ha sugerido que la ausencia de linfocitos B maduros en los OLS podría generar un cambio en el microambiente de los CG que la facilitase^{146, 147, 148}.

Por otra parte, cabe destacar que nuestro estudio constituye el único en que se ha estudiado un número tan elevado de ciclos sucesivos y podemos concluir que, en nuestros pacientes, no se observaron efectos acumulativos por los sucesivos ciclos de RTX, lo que sugiere que el proceso ontogénico se reinicia con cada nueva administración de RTX.

También es interesante destacar que un patrón de repoblación similar al observado en esta tesis ha sido descrito tanto en el trasplante de MO¹⁴⁹ como en otras enfermedades autoinmunes ya sea tratadas o no con RTX^{129, 146, 150}. En todos los casos, la recuperación de la población B de memoria tiene lugar a largo plazo o incluso parece no darse de forma completa tras muchos años del tratamiento, como hemos demostrado recientemente en un grupo de pacientes con mieloma múltiple que permanecen en remisión completa tras muchos años del trasplante¹⁵¹. Dicho grupo se caracteriza por presentar un número muy bajo de linfocitos B de memoria y precisamente los pacientes con AR tratados con RTX en cuya repoblación predominan los linfocitos transicionales y/o naïve parecen tener mejor pronóstico que aquellos con un mayor número o proporción de linfocitos B de memoria o plasmablastos en SP durante la

reconstitución de las células B en los meses posteriores a la infusión del anticuerpo^{128, 152-154}. De esta forma, la detección de células B de memoria en SP, aunque sea a niveles muy bajos, a través de técnicas sensibles como la CMF multiparamétrica que se usa para la detección de la enfermedad mínima residual en las neoplasias hematológicas, podría ser un marcador de recaída y ser de utilidad para predecir cuándo hay que aplicar el siguiente ciclo de tratamiento en los pacientes no concordantes. Estos hallazgos están pendientes de confirmación en nuestro estudio. En este sentido, solo hemos observado una tendencia no significativa a que aquellos pacientes en los que se administró un mayor número de ciclos de RTX se detectase un menor porcentaje de plasmablastos en el momento previo a la administración del siguiente ciclo de RTX. Este hecho, a priori, podría relacionarse con lo descrito por otros autores ya que los pacientes que mejor responden al tratamiento con RTX son aquellos que se mantienen con el tratamiento y por tanto, a quienes se les administra un mayor número de ciclos RTX.

Además del estudio de la reconstitución inmunitaria, también nos interesó la identificación de posibles biomarcadores asociados a la actividad de la enfermedad y/o a la respuesta al tratamiento con RTX, antes del inicio del mismo. En este sentido, se observó una correlación entre el porcentaje de linfocitos B transicionales con el nivel de actividad de la enfermedad pero no está claro si esta subpoblación podría ser de utilidad para predecir el momento en que los pacientes necesitan un nuevo ciclo de RTX, pues la relación fue más clara en los pacientes que nunca habían recibido el tratamiento previamente.

Por otro lado, también estábamos interesados en estudiar el comportamiento de los linfocitos B CD21low, así como de los linfocitos B que expresan CCR6+, por su posible papel en la patogénesis de la AR. Los linfocitos B CD21low actúan presentando de forma eficiente antígenos a los linfocitos T, presentan mayores niveles de receptores de quimiocinas inflamatorias y parecen presentar una migración preferencial a tejidos periféricos como la membrana sinovial en la AR^{101, 155, 156}. Por su parte, dada la producción local de ligandos de CCR6 (CCL20) en la membrana sinovial de pacientes con AR, la expresión de este receptor de quimiocinas en subpoblaciones de linfocitos B, puede contribuir a la formación de órganos linfoides terciarios en las articulaciones de estos pacientes^{157, 158}.

El porcentaje de linfocitos B CD21low en la visita de inicio fue mayor en pacientes que nunca habían estado expuestos a RTX en comparación con aquellos pacientes que se encontraban en sus ciclos sucesivos del tratamiento. Se ha descrito que esta subpoblación de linfocitos B aumenta en pacientes con trastornos autoinmunes^{101, 155}. Por lo tanto, la disminución de los linfocitos B CD21low puede valorarse como un posible mecanismo de acción de RTX en la AR. Sin embargo, el diseño de nuestro estudio no permite determinar si el menor

porcentaje de linfocitos B CD21low en pacientes tratados con RTX, es la causa o la consecuencia de una menor actividad de la enfermedad.

Por su parte, nuestro estudio muestra una proporción significativamente menor de linfocitos B CCR6+ en pacientes que habían recibido tratamiento previo con RTX en la visita inicial de sus ciclos sucesivos de RTX en comparación con los pacientes que no habían recibido tratamiento previo. Se ha descrito que la expresión de CCR6 en los linfocitos B de memoria es esencial para desarrollar una respuesta de recuerdo a un antígeno específico, ya que sin este receptor de quimiocinas los linfocitos B maduros no se localizan en su ubicación apropiada en los folículos linfoides^{159, 160}. Además, se ha descrito que CCR6 y su ligando CCL20 están involucrados en la inducción del crecimiento de células pre-B¹⁶¹.

En resumen, nuestros hallazgos con respecto al impacto de RTX en las diferentes subpoblaciones de linfocitos B estudiadas, respaldan estudios previos que sugieren que la repoblación de linfocitos B después de la depleción con RTX sigue un patrón similar en todos los pacientes, que recuerda al proceso madurativo normal de los linfocitos B y que no hay efectos aditivos en las diferentes subpoblaciones estudiadas. Queda por definir, tanto en nuestro estudio como en estudios futuros, la asociación de la reaparición precoz de determinadas subpoblaciones B con un nuevo brote de la enfermedad o la asociación del número de determinadas subpoblaciones B, como los linfocitos B transicionales, antes del tratamiento con RTX con la respuesta a dicho tratamiento; y todo ello tanto en pacientes concordantes como en discordantes.

Por otro lado, en cuanto al papel patogénico de los linfocitos B, podemos decir que la disminución de algunas de sus subpoblaciones como los de memoria, los linfocitos B CD21low y los CCR6+ podrían constituir objetivos más específicos de terapias futuras.

También desde el punto de vista de la patogénesis, nuestros datos en conjunto confirman el papel esencial de los linfocitos B, y más en concreto de las poblaciones B mencionadas en el párrafo anterior, en el desarrollo y la progresión de la AR. Como se anticipaba en la introducción dicho papel no sólo se restringe a la producción de anticuerpos sino a muchas otras funciones relevantes como la presentación antigénica a los linfocitos T, la coestimulación de los linfocitos T, la polarización de los mismos hacia un determinado tipo de T helper o la propia organización del tejido linfoide. Los conocimientos aportados en esta tesis pueden ser por tanto de utilidad para identificar aquellas poblaciones B cuyo papel patogénico en la AR merece la pena investigar.

Efecto de la administración de Rituximab en las subpoblaciones de linfocitos T

En nuestro estudio no hemos encontrado ninguna diferencia estadísticamente significativa en la proporción de las dos principales subpoblaciones T, CD4+ ni CD8+, ni tampoco de sus correspondientes subpoblaciones, ni siquiera en los pacientes con mayor número de ciclos administrados. Estos resultados confirman los publicados por Leandro *et al.* o más tarde por Thurlings *et al.* en los que tampoco se encontró ningún efecto de la terapia con RTX en los linfocitos T CD4+ o CD8+ totales en SP de pacientes con AR ni en las subpoblaciones de memoria y naïve definidas por su expresión en superficie celular de CD45RA y CD45RO^{129, 162}. Estos datos contrastan con los publicados recientemente por Sentís *et al.*¹⁶³ que describen un aumento del porcentaje de los linfocitos T CD8+ totales precozmente tras el tratamiento con RTX (15 días a 3 meses), aunque las patologías y pautas de tratamiento son muy diferentes a las descritas en esta tesis.

Pero sin duda, unos de los mejores escenarios para estudiar el efecto de la eliminación de los linfocitos B sobre las poblaciones T es el estudio de dichas subpoblaciones en el contexto de la agammaglobulinemia ligada al X y de inmunodeficiencia común variable con menos de un 2% de linfocitos B en sangre periférica. En este sentido, una publicación de Martini H. *et al* sobre el impacto de la ausencia de linfocitos B sobre los linfocitos T, detecta una disminución de los linfocitos T CD4+ de memoria con inmunofenotipo CD4+ CD45RO+ y de los linfocitos T CD4+ CD45RO+ CXCR5+ en los pacientes con dichas patologías en comparación con controles sanos¹⁶⁴. Estos resultados fueron confirmados en estudios posteriores^{165, 166}. De nuevo, las diferencias en las patologías estudiadas y en la estrategia de análisis podrían explicar las diferencias observadas. El único hallazgo que parece ser concordante con el estudio de Martini *et al* es que en los pacientes tratados con Rituximab hay una tendencia a que los linfocitos T CD4+ foliculares (CD4+ PD1+ CXCR5+) disminuyan a lo largo de cada ciclo del fármaco y que además su proporción tiende a disminuir cuantos más ciclos de RTX ha recibido el paciente. Esta población que nosotros hemos estudiado específicamente está incluida en la subpoblación de células CD4 de memoria (CD4+ CD45RO+ CXCR5+) estudiada por Martini *et al*. La función de los linfocitos T CD4 foliculares es cooperar con los linfocitos B en el centro germinal para facilitar el cambio de isotipo y el aumento de afinidad de los anticuerpos y se ha descrito que esta población se encuentra aumentada en enfermedades autoinmunes como la AR⁹¹. Podemos proponer por tanto que la eliminación transitoria y repetida de los linfocitos B podría afectar a la diferenciación de los linfocitos naïve hacia linfocitos T foliculares, lo que colaboraría con la disminución de la síntesis de autoanticuerpos de alta afinidad.

Por otra parte, el estudio de pacientes con agammaglobulinemia ligada al X, no ha encontrado diferencias en los porcentajes de linfocitos T CD8+ ni de sus poblaciones naïve y de memoria con respecto a los controles sanos¹⁶⁵ hallazgos que concuerda totalmente con nuestro estudio.

En lo que respecta a otras subpoblaciones más específicas dentro de los linfocitos CD4+, Leandro *et al.* describieron al mes del tratamiento con RTX una disminución de los linfocitos T CD4+ CD25++, entre los que se incluyen las células T reguladoras. Posteriormente, la disminución de CD4+ CD25++ revertía a los tres meses¹²⁹. En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los linfocitos T CD4+ CD25++ en ninguna de las estrategias de análisis. Dado que nuestro estudio utilizó excedentes de muestras obtenidas durante el seguimiento en práctica clínica habitual, nuestro estudio no pudo evidenciar esta la disminución transitoria de dicha población, ya que tras la infusión de RTX, la primera visita de los pacientes se realiza a los 3 meses.

Probablemente el hallazgo más relevante dentro de las subpoblaciones T atañe a dos fenotipos estudiados por su potencial importancia en AR. Las células T CD4+ CCR6+ representan una población heterogénea que incluye fundamentalmente células Th17 y Th22 y otras poblaciones no clasificadas o intermedias^{167, 168}. Diversos autores describen que los linfocitos T CD4 efectoras que expresan CCR6 se encuentran aumentados en pacientes con AR^{81, 82, 169}. Dentro de la subpoblación CD4+CCR6+, nos interesó estudiar aquellos linfocitos que además expresan CXCR6+ porque se ha detectado un aumento de linfocitos T CD4+ CCR6+ CXCR6+ en líquido sinovial de pacientes con AR. Aunque no se ha descrito que CXCR6 sea crítico para la localización de células T en estos focos de inflamación para que realicen su función efectora, es probable que actúe de manera coordinada con otros receptores quimioatrayentes en estos procesos¹⁷⁰.

Nuestros resultados muestran que tanto CD4+CCR6+, como su subpoblación que además expresa CXCR6, están significativamente más elevados en pacientes que nunca han recibido RTX que en aquellos que ya han recibido este tratamiento. Además, durante el primer ciclo de tratamiento (ciclos naïve), se detecta una rápida y significativa disminución de los linfocitos CD4+ CCR6+ CXCR6+. Esta disminución es menos llamativa, no alcanza significación estadística en la población “madre” CD4+CCR6+, y puede observarse tanto en ciclos naïve como sucesivos. Una explicación plausible para estos hallazgos es que, aunque el total de linfocitos T CD20+ no difiere entre pacientes con AR y sujetos sanos¹⁷¹, en los primeros una población significativa de linfocitos T secretores de IL-17 (~25%) expresan el antígeno CD20 en su superficie celular, mientras que los linfocitos T CD20+ secretores de IL-17 rara vez se detectan

en voluntarios sanos¹⁷¹. Este hallazgo había sido descrito también en otras patologías autoinmunes como el síndrome de Sjögren¹⁷², así como por Leandro *et al* en los primeros estudios de RTX en AR¹²⁹. Posteriormente, varios estudios, han demostrado sistemáticamente una población de hasta el 5% de linfocitos T CD3+ de sangre periférica en pacientes con AR que expresan niveles bajos de CD20 de superficie^{129, 171, 173}.

Por lo tanto, la marcada y rápida disminución en la población CCR6+ que ocurre durante los tres primeros meses tras la primera infusión de RTX, puede ser debida a un efecto directo del anticuerpo anti-CD20, por mecanismos tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o dependiente de complemento.

Desde el punto de vista funcional, van de Veerdonk *et al.* mostraron que estimulando “*in vitro*” células mononucleares de sangre periférica con *C. albicans*, que activa la ruta Th17, en presencia de RTX, se reducía tanto el número como la actividad de los linfocitos Th17 (disminución de la secreción de IL17 y IL22), comparado con la estimulación en ausencia de RTX. En cambio, cuando los experimentos se realizaban con células mononucleares de sangre periférica procedentes de enfermos con agammaglobulinemia ligada al X que no tienen linfocitos B circulantes funcionales, la presencia de RTX no alteró ni el porcentaje de linfocitos Th17, ni la producción de IL-17¹⁷⁴.

Probablemente, la ausencia de células B y T CD20+ en SP de pacientes con agammaglobulinemia ligada a X descrita por Futatani *et al.*¹⁷⁵ podría ser la razón por la que no se ve disminución del número de linfocitos Th17 en el modelo *in vitro* en presencia de RTX descrito por van de Veerdonk *et al.* En nuestro estudio, se observa que las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ CCR6+ y CCR6+ CXCR6+ no consiguen alcanzar los niveles previos al tratamiento con RTX en aquellos casos en los que el tratamiento continúa con ciclos sucesivos, sugiriendo que algunas subpoblaciones de linfocitos Th17 precisarían de células B para su correcta diferenciación. Sería interesante hacer un seguimiento de estas subpoblaciones de células T en los pacientes que suspenden definitivamente el tratamiento con RTX, para ver si se reconstituyen.

Por último, el porcentaje de linfocitos T CD4+ CCR6+ CXCR6+ en SP se correlacionó de forma casi significativa con la actividad de la enfermedad, especialmente en los pacientes sin tratamiento previo. En este sentido, Salomon S. *et al.*, en un estudio de respuesta a terapias biológicas que no incluye RTX, describe que porcentajes elevados de linfocitos Th17 (definidos como CD4+ CD45RA-CD161+CCR6+) se asocian a menor posibilidad de conseguir buena

respuesta EULAR, posiblemente por un mayor nivel de actividad de la enfermedad en la visita basal¹⁷⁶.

En este sentido, son varias las publicaciones donde se estudia la asociación entre la actividad de la enfermedad valorada con DAS28 y las subpoblaciones de linfocitos T. Estudios previos como el de Diaz-Torné *et al.* que describen una asociación inversa del ratio linfocitos T CD8+ CD45RO+/CD54RA+ y la actividad de la enfermedad valorada con DAS28¹⁷⁷, o los estudios realizados por Mélet *et al.* y Lavielle *et al.* que relacionan la disminución del valor absoluto en células/μL de CD4+ totales con una disminución del valor de DAS28^{178, 179}. Ninguna de estas asociaciones se encontró en nuestro estudio, probablemente porque las variables analizadas fueron diferentes.

Además, al realizar la caracterización de nuestros pacientes, se observó un descenso de la actividad de la enfermedad medida por el índice DAS 28, al aumentar el número de ciclos de tratamiento. Las razones de este hecho pueden ser varias, siendo la explicación más probable que debido a la experiencia de varios ciclos, los pacientes y sus reumatólogos son capaces de ajustar mejor el momento de una nueva infusión antes de que se produzca un brote muy intenso de la enfermedad. Otras razones que podrían explicar esta disminución de la actividad de la enfermedad, podrían ser la disminución de linfocitos T CD4+ foliculares, los cuales están directamente implicados en la generación de autoanticuerpos, o la disminución de plasmablastos que se produce con el aumento de los ciclos de tratamiento.

El principal inconveniente de nuestro estudio fue la imposibilidad de recopilar suficiente información para determinar si los cambios en las subpoblaciones de linfocitos B y T estaban relacionados con la respuesta a RTX, ya que la mayoría de los pacientes estudiados estaban en ciclos sucesivos. Esto significa que eran respondedores y la proporción de pacientes que no respondieron en ciclos no tratados anteriormente fue demasiado baja para permitir dicho análisis.

En resumen, para evaluar el impacto global de RTX en la respuesta inmunitaria, es básico considerar sus consecuencias más allá de la eliminación de los linfocitos B. El estudio de las subpoblaciones de linfocitos T es de vital importancia para identificar nuevos mecanismos de acción de RTX en patologías autoinmunes mediadas preferentemente por linfocitos T autoreactivos. En este sentido, varias subpoblaciones de células B y T deberían ser estudiadas con mayor profundidad para determinar su posible utilidad como marcadores de respuesta a RTX o de la necesidad de un nuevo ciclo de tratamiento, especialmente en los pacientes no

Discusión

concordantes en los que la recaída se produce meses después de la aparición de células B en sangre periférica.

CONCLUSIONES

1. Rituximab es un tratamiento efectivo para la eliminación de linfocitos B de sangre periférica en pacientes con AR, sin que se hayan visto diferencias significativas entre el uso de 1 ó 2 g de rituximab por ciclo, ni por el número de ciclos de tratamiento administrados.
2. La reaparición de los linfocitos B tras cada ciclo sigue el patrón ontogénico normal, sin que se observen efectos acumulativos en las diferentes subpoblaciones de linfocitos B tras la administración de sucesivos ciclos.
3. Los pacientes que han recibido ciclos anteriores de RTX presentan una menor proporción de linfocitos B de memoria y mayores de linfocitos B de transición en la visita basal y no se detectan diferencias significativas entre los dos grupos de pacientes a excepción de una proporción menor de linfocitos B de transición, el mes 8, en pacientes en su primer ciclo de tratamiento.
4. Se ha observado una asociación entre el porcentaje de linfocitos B transicionales y la actividad de la artritis reumatoide.
5. No se han observado efectos acumulativos con la administración de ciclos sucesivos de RTX en las subpoblaciones de linfocitos T.
6. Los linfocitos T CD4 CCR6+, que incluyen poblaciones relevantes en la patogenia de la artritis reumatoide como los linfocitos T CD4 Th17 y Th22, disminuyen tras el primer ciclo de RTX, para posteriormente mantenerse estables a niveles más bajos cuando se administran ciclos sucesivos del fármaco.
7. Dentro de la población anterior, los que expresan CXCR6, receptor que favorece su migración a focos de inflamación, siguen un patrón similar, con descenso del porcentaje de esta subpoblación con el primer ciclo y mantenimiento de menores niveles en ciclos sucesivos. Además, su porcentaje se correlaciona con la actividad de la enfermedad.
8. Los linfocitos T foliculares tienden a disminuir después de cada administración de RTX, indistintamente de si son ciclos naïve o sucesivos. Además, su porcentaje tiende a correlacionar positivamente con la actividad de la enfermedad

BIBLIOGRAFÍA

1. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007. 449, 819-826.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier, Saunders; 2015.
3. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745-763.
4. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 2003; 4(9):835-842.
5. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401(6754):708-712. doi:10.1038/44385.
6. Tada, T., T. Takemori, K. Okumura, M. Nonaka, and T. Tokuhisa. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J Exp Med*. 1978;147:446-58.
7. Dong, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL17-producing cells. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:329-33.
8. Mosmann TR. T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 664: 89–92
9. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988; 334: 255–258
10. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 281–286
11. Kurts, C. Th17 cells: a third subset of CD4+ T effector cells involved in organ-specific autoimmunity. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2008; **23**:816-819
12. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009; 10: 857–863.
13. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119: 3573–3585.
14. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2009; 10: 864–871.
15. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62. 2.

16. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52
17. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.
18. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 595–602
19. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983: 302, 575-581.
20. Alt FW et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* 1984: 3, 1209-1219.
21. Tobòn GJ et al. B lymphocytes: Development, tolerance, and their role in autoimmunity—Focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis*. 2013, 827254
22. Nunez C et al. B cells are generated throughout life in humans. *J Immunol* 1996: 156, 866-872.
23. Naradikian MS et al. Understanding B cell biology. In *Drugs targeting B-cells in autoimmune diseases, Milestones in drug therapy*, X. Bosch et al., eds. (Springer Basel), 2014: pp. 11-35.
24. Warnatz K, Schlesier M. Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008 Sep;74(5):261-71.
25. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376:1094- 108.
26. Malmstrom V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat rev Immunol*. 2017;17:60- 75.
27. Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(6):733-45.
28. Alarcon GS. Epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 1995;21(3):589-604.
29. Carmona L, Villaverde V, Hernandez-García C, Ballina J, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41:88-95.
30. Carbonell J, Cobo T, Balsa A, Descalzo MA, Carmona L. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:1088-92.
31. Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. et al. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1994;37, pp. 481-94
32. Linos A, Worthington JW, O'Fallon WM, Kurland LT. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota: a study of incidence, prevalence, and mortality. *Am J*

- Epidemiol, 111; 1980: pp. 87-98
33. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023-38.
 34. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: Results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 903-7
 35. Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rehumatoide arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42(6):1071-9.
 36. Dieude P, Cornelis F. Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2005;72(6): 520-6.
 37. Frisell T, Holmqvist M, Kallberg H, et al. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2773-82.
 38. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22:293-8.
 39. Viatte S. et al. Geneti and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Mar;9(3):141-53
 40. Fu XT, Bono CP, Woulfe SL, et al. Pocket of the hla-dr(alpha, beta 1*0401) molecule is a major determinant of cells recognition of peptide. *J Exp Med* 1995; 181:915-26
 41. Fries JF, Wolfe F, Appel R, et al. Hla-drb1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: Frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2320-9.
 42. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506:376-81.
 43. Rodriguez-Rodriguez L, Taib WR, Topless R, et al. The PTPN22 R263Q polymorphism is a risk factor for rheumatoid arthritis in Caucasian case-control samples. *Arthritis Rheum*. 2011;63:365-72.
 44. Vassey MP, Villard-Mackintosh L, Yeates D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception* 1987; 35(5):457-64.
 45. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2007;80:867-75.
 46. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006;54:38-46.
 47. Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, et al. Silica exposure among male current smokers ia

- associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69(6): 1072-6.
48. Sigaux J, Biton J, André E, Semerano L, Boissier MC. Air pollution as a determinant of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2018 Mar 7. pii:S1297-319X(18)30043-5.
49. Gan RW, Deane KD, Zerbe GO, Demoruelle MK, Weisman MH, Buckner JH, Gregersen PK, Mikuls TR, O'Dell JR, Keating RM, Holers VM, Norris JM. Relationship between air pollution and positivity of RA-related autoantibodies in individuals without established RA: a report on SERA. *Ann Rheum Dis*. 2013 Dec;72(12):2002-5.
50. Hart JE, Källberg H, Laden F, Bellander T, Costenbader KH, Holmqvist M, Klareskog L, Alfredsson L, Karlson EW. Ambient air pollution exposures and risk of rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jun;72(6):888-94.
51. Mercado FB, Marshall RI, et al. Relationship between rheumatoid Arthritis and periodontitis. *J Perodontol* 2001; 72:779-87.
52. Rosenstein ED, Greenwald RA, et al. The humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2004;28:311-8.
53. König MF, Abusleme L, Reinholdt J, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016;8(369):369ra176.
54. Scher JU, Abramson SB, The microbiome and rheumatoid Arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:569-78
55. Cenit MC, Matzaraki V, Tigchelaar EF, et al. Rapidly expanding knowledge on the role of the gut microbiome in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(10):1981-92.
56. Feng J, Chen Q, Yu F, et al. Body Mass Index and Risk of Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e2859.
57. Proudman SM, James MJ, Spargo LD, Metcalf RG, Sullivan TR, Rischmueller M, Flabouris K, Wechalekar MD, Lee AT, Cleland LG. Fish oil in recent onset rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind controlled trial within algorithm-based drug use. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jan;74(1):89-95.
58. Kleiweietfeld M, Manzel A, Titz J, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013;496:518-22.
59. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Frisch M. Socioeconomic status and risk of rheumatoid arthritis: a Danish case-control study. *J Rheumatol* 2006;(6):1069-74.

60. Lozano JA. Artritis reumatoide (1). Etiopatogénia, sintomatología, diagnóstico y tratamiento. *Offarm* 2001;20:94-101.
61. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mc Shane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31(3):315-24.
62. Schellekens GA, DE Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij. Citruline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1988;101(1):273-81.
63. Sebbag M, Simon M, Vicent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ, et al. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthriris-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 1995;95(6):2672-9.
64. Gyorgy B, Toht E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. Citrullination: a Posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;(10): 1662-77.
65. Suzuki K, Sawada T, Murakami A, et al. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2003;32(4):197-204.
66. Nishimura K, Sugiyama D, Kogota Y et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anty-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 2007;146(11):797-808.
67. Whiting PF, Smidt N, Steme JA, et al. Systematic rewiev: Accuracy of anti-citrullinated peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 2010 Apr 6;152(7):456-64; W155-66.
68. Bas S, Genevay S, Meyer O, et al. Anti.cyclic citrullinated peptide antibodies, IgM and IgA rheumatoid factors in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthrosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:677-80.
69. Naredo E, Bonilla G, Gamero F, Uson J, Carmona L, Laffon A. Assessment of inflammatory activity in rheumatoid arthritis: a comparative study of clinical evaluation with grey scale and power Doppler ultrasonography. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:375-81.
70. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.* 2010 Sep;69(9):1580-8.
71. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: An American college of rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis.*2010; 69: 1580-8.

72. Aletaha D, T. Neogi, A.J. Silman, J. Funovits, D.T. Felson, C.O. Bingham 3rd 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2569-81.
73. Catrina AI, Ytterberg AJ, Reynisdottir G, et al. Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(11):645-53.
74. Scher JU, Abramson SB. Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis*, and rheumatoid arthritis: what triggers autoimmunity and clinical disease? *Arthritis Res Ther* 2013; 15: 122.
75. Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 1090–1100.
76. Ishikawa H, Hirata S, Andoh Y, et al. An immunohistochemical and immunoelectron microscopic study of adhesion molecules in synovial pannus formation in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1996;16:53-60.
77. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, et al. Activated human t cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: Possible role of t cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2001;44:100312.
78. Tak PP, Smeets TJ, Daha MR, et al. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:217-25
79. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio AF, Puxeddu I, Alunno A.. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2018 Mar-Apr;36(2):175-184
80. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, Kavanaugh A, McInnes IB, Solomon DH, Strand V, Yamamoto K.. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Feb 8;4:18001
81. Gullick, N.J., Evans, H.G., Church, L.D., Jayaraj, D.M., Filer, A., Kirkham, B.W., Taams, L.S., 2010. Linking power Doppler ultrasound to the presence of th17 cells in the rheumatoid arthritis joint. *PloS One* 5.
82. Shen, H., Goodall, J.C., Hill Gaston, J.S., 2009. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60, 1647–1656.
83. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C, Malmström V. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:R335–R346.

84. van Amelsfort JMR, Jacobs KMG, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Taams LS. CD4+CD25+ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 2004;50:2775–2785.
85. Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, Douglas SH, Burgoyne CH, Greenstein AS, Boylston AW, Emery P, Ponchel F, Isaacs JD. Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1210–1217.
86. Jiao Z, Wang W, Jia R, Li J, You H, Chen L, Wang Y. Accumulation of FoxP3-expressing CD4+CD25+ T cells with distinct chemokine receptors in synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2007;36:428–433
87. Kawashiri SY, Kawakami A, Okada A, Koga T, Tamai M, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Eguchi K. CD4+CD25highCD127low/- Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2011;38:2517–2521.
88. Cao D, Malmström V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2003;33:215–223.
89. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2005;140:360–367.
90. Han GM, O'Neil-Andersen NJ, Zurier RB, Lawrence DA. CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008;253:92–101
91. J. He, L.M. Tsai, Y.A. Leong, X. Hu, C.S. Ma, N. Chevalier Circulating precursor CCR7loPD-1hi CXCR5+ CD4+ T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity.*,2013: 39, pp. 770-781
92. J. Ma, Ch. Zhu, B. Ma, J. Tian, S.E. Baidoo, C.H. Mao. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol.*, 2012: pp. 1-7
93. A. Chakera, S.C. Bennett, O. Morteau, P. Bowness, R.A. Luqmani, R.J. Cornall The phenotype of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target. *Clin Dev Immunol.*, 2012: pp. 1-10
94. I. Arroyo-Villa, M.B. Bautista-Caro, A. Balsa, P. Aguado-Acín, M.G. Bonilla-Hernán, C.H.

- Plasencia. Constitutively altered frequencies of circulating follicular helper T cell counterparts and their subsets in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.*, 2014; 16, pp. 500
95. J. Wang, Y. Shan, Z. Jiang, J. Feng, C. Li, L. Ma. High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.*, 2013; 174, pp. 212-220
96. Edwards JC, Cambridge G, Abrahams VM. Do self-perpetuating b lymphocytes drive human autoimmune disease? *Immunology* 1999;97:188-96
97. Harre U, Lang SC, Pfeifle R, et al. Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. *Nat Commun.* 2015;6:6651.
98. Hye-Jung Kim and Claudia Berek. B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000; 2(2): 126–131.
99. van de Sande MG, de Hair MJ, Schuller Y, et al. The features of the synovium in early rheumatoid arthritis according to the 2010 acr/eular classification criteria. *PLoS One*;7:e36668
100. Adlowitz DG, Barnard J, Biear JN, Cistrone C, Owen T, Wang W, Palanichamy A, Ezealah E, Campbell D, Wei C, Looney RJ, Sanz I, Anolik JH. Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PLoS One.* 2015 Jun 5;10(6):e0128269.
101. Shimabukuro-Vornhagen, A., García-Márquez, M., Fischer, R. N., Iltgen-Breburda, J., Fiedler, A., Wennhold, K., ... von Bergwelt-Baildon, M. Antigen-presenting human B cells are expanded in inflammatory conditions. *Journal of Leukocyte Biology*, 2016; 101(2), 577–587.
102. Nanki T1, Takada K, Komano Y, Morio T, Kanegane H, Nakajima A, Lipsky PE, Miyasaka N. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):R149
103. Arend WP. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum* 2001;30(5 Suppl 2):1-6
104. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):429-42.
105. Karmakar S, Kay J, Gravallese EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010;36:385–404.
106. González D., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A. TNFa-induced apoptosis in human myeloid cell lines HL-60 and K562 is dependent of intracellular ROS generation. *Mol Cell Biochem*

- 2014;390: 281-287.
107. J.A. Hamilton, P.P. Tak. The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.*,2009: 60, pp. 1210-1221.
 108. McInnes IB, al-Mughales J, Field M, et al. The role of interleukin-15 in t-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996;2:175-82
 109. Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W. J et al. High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol.* 2000 Mar 1; 164(5):2832-8.
 110. Jin Y, Chen X, Gao Z, Liu K, Hou Y, Zheng J. et al. Expression levels of IL-15 and IL-17 in synovial fluid of rheumatoid arthritis animal model. *Exp Ther Med.* 2018 Oct;16(4):3377-3382.
 111. Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh, S. Ishiyama, S. Saito, K. Inoue, N. Kamatani, M. T. Gillespie, T. J. Martin, T. Suda. 1999. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 103: 134
 112. . Chabaud M, Durand JM, Buchs N, et al. Human interleukin-17: A t cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1999;42:963- 70.
 113. Kaplanski G et al. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2018 Jan;281(1):138-153.
 114. Paradowska-Gorycka A, Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E, Maslinski S. IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* 2010;71:134–45
 115. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant.* 2006;6(5 Pt 1):859–866.
 116. Maloney DG, Snith B, Rose A. Rituximab: mechanism of action and resistance. *Semin Oncol* 2002; 29 (1 Suppl 2):2-9. No
 117. Szodoray P, Alex P, Dandapani V, et al. Apoptotic effect of rituximab on blood cells in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2004: 60 209-18 no
 118. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP et al. Mechanisms of killing by anti-cd20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 2007 44: 3823-37
 119. Cambridge G, Torre I de L. Response to rituximab: has the original hypothesis been confirmed? *Curr Pharm Des.* 2015;21:212-20.
 120. Reff ME, Carner K, Chambers Ks, Chinn PC, Leonard JE, Raab R et al. Depletion of B-cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994 83: 435-

121. Cohen SB, Emery P, Greenwald M, Dougados M, Furie R, Genovese M et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy Arthritis Reum 2006; 54: 2793-2806.
122. Cohen, Emery P. Greenwald M. Dougados M, Furie R. Burmester G et al. Prolonged efficacy of a single course of rituximab in rheumatoid arthritis patients with inadequate response to one or more TNF inhibitors: 1-year follow-up of a controlled trial (REFLEXStudy, Ann Rheum Dis 2006, 65 (Suppl 2): 183
123. . Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological diseasemodifying antirheumatic drugs: 2013 update. Ann Rheum Dis. 2014;73:492-509.
124. Martin Mola E, Hernandez B, Garcia-Arias M, et al. [Consensus on the Use of Rituximab in Rheumatoid Arthritis. A document with evidence-based recommendations. Grupo de Expertos en Rituximab.]. Reumatol Clin. 2011;7:30-44.
125. Edwards JCW, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. N Engl J Med 2004 350 (25) 2572-81.
126. Berinstein NL. Principles of maintenance therapy. Leuk Res 2006 Mar, 30 Suppl 1: S3-10.
127. Kimby E. Tolerability and safety of rituximab (MabThera). Cancer Treat Rev 2005; 31 (6) 456-73
128. Nakou M, Katsikas G, Sidiropoulos P, et al. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. Arthritis Res Ther. 2009;11:R131.
129. Leandro, M. J., Cambridge, G., Ehrenstein, M. R., & Edwards, J. C. W. Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism, 2006: 54(2), 613–620.
130. Silverman GJ. Therapeutic B cell depletion and regeneration in rheumatoid arthritis: emerging patterns and paradigms [review]. Arthritis Rheum 2006;54:2356–67.
131. Roll P, Palanichamy A, Kneitz C, Dorner T, Tony HP. Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2006;54:2377-86.
132. Muhammad K, Roll P, Einsele H, Dorner T, Tony HP: Delayed acquisition of somatic hypermutations in repopulated IGD+CD27+ memory B cell receptors after rituximab

- treatment. *Arthritis Rheum* 2009; 60(8), 2284-2293.
133. Esteve-Vives J, Batlle-Gualda E, Reig A. Spanish version of the Health Assessment Questionnaire: reliability, validity and transcultural equivalency. Grupo para la Adaptacion del HAQ a la Poblacion Espanola. *J Rheumatol.* 1993;20(12):2116-22
 134. Cañamares-Orbis I, Merino L, López J, Llorente I, García-Vadillo A, Ramirez E, López-Bote JP, Benedí J, Muñoz-Calleja C, Álvaro-Gracia JM, Castañeda S, González-Álvaro I. Experience With the Use of Rituximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in a Tertiary Hospital in Spain: RITAR Study. *J Clin Rheumatol.* 2018 Jul 19.
 135. Dass S, Rawstron AC, Vital EM, Henshaw K, McGonagle D, Emery P. Highly sensitive b cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2993-9.
 136. Vancsa A, Szabo Z, Szamosi S, et al. Longterm effects of rituximab on b cell counts and autoantibody production in rheumatoid arthritis: Use of high-sensitivity flow cytometry for more sensitive assessment of b cell depletion. *J Rheumatol* 2013;40:565-71.
 137. Díaz Torné C. Avances clínicos e inmunológicos en la respuesta al tratamiento con terapia detectora de linfocitos B (Rituximab®) en pacientes con artritis reumatoide. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Departamento de Medicina 2013. Universidad Autónoma de Barcelona.
 138. Smolen, J. S., Landewé, R., Bijlsma, J., Burmester, G., Chatzidionysiou, K., Dougados, M., van der Heijde, D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2017;76(6), 960–977.
 139. Guillevin, L., Pagnoux, C., Karras, A., Khouatra, C., Aumaître, O., Cohen, P., ... Mouthon, L. Rituximab versus Azathioprine for Maintenance in ANCA-Associated Vasculitis. *New England Journal of Medicine*, 2014: 371(19), 1771–1780.
 140. Specks, U., Merkel, P. A., Seo, P., Spiera, R., Langford, C. A., Hoffman, G. S., ... Stone, J. H. Efficacy of Remission-Induction Regimens for ANCA-Associated Vasculitis. *New England Journal of Medicine*, 2013: 369(5), 417–427.
 141. Auger, S., Duny, Y., Rossi, J. F., & Quittet, P. Rituximab before splenectomy in adults with primary idiopathic thrombocytopenic purpura: a meta-analysis. *British Journal of Haematology*, 2012;158(3), 386–398.
 142. Gottenberg JE, Ravaud P, Bardin T, Cacoub P, Cantagrel A, Combe B, et al. Risk factors for severe infections in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in the autoimmunity and rituximab registry. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2625-32. Epub 2010/05/28. doi: 10.1002/art.27555

143. Vital EM, Rawstron AC, Dass S, Henshaw K, Madden J, Emery P, et al. Reduced-dose rituximab in rheumatoid arthritis: efficacy depends on degree of B cell depletion. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):603-8.
144. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer research.* 2004;64(13):4664-9.
145. Kastbom A, Coster L, Arlestig L, Chatzidionysiou A, van Vollenhoven RF, Padyukov L, et al. Influence of FCGR3A genotype on the therapeutic response to rituximab in rheumatoid arthritis: an observational cohort study. *BMJ open.* 2012;2(5).
146. Anolik JH, Barnard J, Owen T et al.: Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 2007: 56(9), 3044-3056.
147. Anolik JH, Friedberg JW, Zheng B et al.: B cell reconstitution after rituximab treatment of lymphoma recapitulates B cell ontogeny. *Clin Immunol* 2007: 122(2), 139-145.
148. Iwata S, Saito K, Tokunaga M, Tanaka Y: Persistent memory B cell down- regulation after 6-year remission induced by rituximab therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2013.
149. Storek J, Ferrara S, Ku N, Giorgi JV, Champlin RE, Saxon A: B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 1993;12(4), 387-398.
150. Sidner RA, et al. In vivo human B-cell subset recovery after in vivo depletion with rituximab, anti-human CD20 monoclonal antibody. *Hum Antibodies.* 2004
151. Artech-López, A., Kreutzman, A., Alegre, A., Sanz Martín, P., Aguado, B., González-Pardo, M. et al. Multiple myeloma patients in long-term complete response after autologous stem cell transplantation express a particular immune signature with potential prognostic implication. *Bone Marrow Transplant.* 2017;52:832-8.
152. Adlowitz DG, Barnard J, Biear JN, Cistrone C, Owen T, Wang W, Palanichamy A, Ezealah E, Campbell D, Wei C, Looney RJ, Sanz I, Anolik JH. Expansion of Activated Peripheral Blood Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis, Impact of B Cell Depletion Therapy, and Biomarkers of Response. *PLoS One.* 2015
153. , Rainer F, Brickmann K, Graninger WB. B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthritis Res Ther.* 2012 Jul 6;14(4):R161.
154. Möller B, Aeberli D, Egli S, Fuhrer M, Vajtai I, Vogelín E, Ziswiler HR, Dahinden CA, Villiger PM. Class-switched B cells display response to therapeutic B-cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R62.

155. , Camponeschi A, Cavallini N et al. CD21(-/low) B cells in human blood are memory cells. *Clin Exp Immunol*. 2016 Aug;185(2):252-62
156. , Keller B, Gutenberger S, Foerster C, Hoenig M, Driessen G, van der Burg M, van Dongen JJ, Wiech E, Visentini M, Quinti I, Prasse A, Voelxen N, Salzer U, Goldacker S, Fisch P, Eibel H, Schwarz K, Peter HH, Warnatz K. Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13451-6.
157. Matsui T, Akahoshi T, Namai R, et al. Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2001;125:155–61.
158. Page G, Lebecque S, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium. *J Immunol* 2002;168:5333–41.
159. , R., Marks, E., Nowak, E., Menezes, S., Benson, M., Raman, V., et al. CCR6-dependent positioning of memory B cells is essential for their ability to mount a recall response to antigen. *J Immunol*. 2015;194:505-13.
160. Reimer D, Lee AY, Bannan J, Fromm P, Kara EF, Comerford I, et al. Early CCR6 expression on B cells modulates germinal centre kinetics and efficient antibody responses. *Immunol Cell Biol*. 2017;95:33-41.
161. , Hiratsuka T, Aini W, Nakamura T. STAT5A Modulates Chemokine Receptor CCR6 Expression and Enhances Pre-B Cell Growth in a CCL20-Dependent Manner. *J Cell Biochem*. 2016;117:2630-42.
162. Thurlings RM, Vos K, Wijbrandts CA, Zwinderman AH, Gerlag DM, Tak PP: Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis*. 2008, 67: 917-925.
163. Sentís A, et al. Kinetic analysis of changes in T- and B-lymphocytes after anti-CD20 treatment in renal pathology. *Immunobiology*. 2017.
164. H. Martini, V. Enright, M. Perro. Et al. Importance of B cell co-stimulation in CD4+ T cell differentiation: X-linked agammaglobulinaemia, a human model. *Clin Exp Immunol*. 2011 Jun; 164(3): 381–387.
165. Bateman EA, Ayers L, Sadler R, Lucas M, Roberts C, Woods A, Packwood K, Burden J, Harrison D, Kaenzig N, Lee M, Chapel HM, Ferry BL. T cell phenotypes in patients with common variable immunodeficiency disorders: associations with clinical phenotypes in comparison with other groups with recurrent infections. 2012 Nov; 170 (2): 202-11.
166. Manish Ramesh, Noa Simchoni, David Hamm, and Charlotte Cunningham-Rundlesb.

- High-throughput sequencing reveals an altered T cell repertoire in X-linked agammaglobulinemia.
167. Francesco Annunziato, Lorenzo Cosmi, Veronica Santarlasci, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1849-61. Epub 2007 Jul 16.
168. Paulissen SM, van Hamburg JP, Dankers W, Lubberts E. The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2015 Jul;74(1):43-53. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.002. Epub 2015 Mar 28.
169. Zhong W1, Jiang Y2,3,4, Ma H1, Wu J5, Jiang Z6, Zhao L. Elevated levels of CCR6+ T helper 22 cells correlate with skin and renal impairment in systemic lupus erythematosus. *Sci Rep*. 2017 Oct 11;7(1):12962.
170. Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB, Butcher EC. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest*. 2001 Mar;107(5):595-601.
171. Eggleton P, Bremer E, Tarr JM, de Bruyn M, Helfrich W, Kendall A, et al. Frequency of Th17 CD20+ cells in the peripheral blood of rheumatoid arthritis patients is higher compared to healthy subjects. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R208.
172. Alunno A, Carubbi F, Bistoni O, Caterbi S, Bartoloni E, Di Benedetto P, Cipriani P, Giacomelli R, Gerli R. Interleukin (IL)-17-producing pathogenic T lymphocytes co-express CD20 and are depleted by rituximab in primary Sjögren's syndrome: a pilot study. *Clin Exp Immunol*. 2016 Jun;184(3):284-92.
173. Wilk E, Witte T, Marquardt N, Horvath T, Kalippke K, Scholz K, et al. Depletion of functionally active CD20+ T cells by rituximab treatment. *Arthritis Rheum* 2009;60:3563–71.
174. van de Veerdonk FL, Lauwerys B, Marijnissen RJ, et al. The anti-cd20 antibody rituximab reduces the th17 cell response. *Arthritis Rheum* 2011;63:1507-16
175. Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, Kurimoto M, Niida Y, Matsuoka H, Sakiyama Y, Iwata T, Tsuchiya S, Tatsuzawa O, Yoshizaki K, Kishimoto T. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood*. 1998 Jan 15;91(2):595-602.
176. Salomon S, Guignant C, Morel P, Flahaut G, Brault C, Gourguechon C, Fardellone P, Marolleau JP, Gubler B, Goëb V. Th17 and CD24hiCD27+ regulatory B lymphocytes are biomarkers of response to biologics in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017 Feb 10;19(1):33.

177. Díaz-Torné C, Ortiz de Juana MA, Geli C, Cantó E, Laiz A, Corominas H, Casademont J, de Llobet JM, Juárez C, Díaz-López C, Vidal S. Rituximab-induced interleukin-15 reduction associated with clinical improvement in rheumatoid arthritis. *Immunology*. 2014 Jul;142(3):354-62.
178. Lavielle M, Mulleman D, Goupille P, Bahaud C, Sung HC, Watier H, Thibault G. Repeated decrease of CD4+ T-cell counts in patients with rheumatoid arthritis over multiple cycles of rituximab treatment. *Arthritis Res Ther*. 2016 Oct 28;18(1):253.
179. Mélet J, Mulleman D, Goupille P, Ribourtout B, Watier H, Thibault G. Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response. *Arthritis Rheum*. 2013 Nov;65(11):2783-90.

ANEXOS

Publicaciones científicas del doctorando durante su tesis doctoral.

Artículos elaborados y relacionados con su tesis doctoral.

López J, Merino L, Piris L, Herrera FS, Llorente I, Humbría A, Ortiz AM, Velasco T, García-Vicuña R, Castañeda S, González Álvaro I, Muñoz-Calleja C. Rituximab induces a lasting, non-cumulative remodelling of the B-cell compartment. Clin Exp Rheumatol. 2018. Epub 2019/01/09. PMID: 30620289.

Cañamares-Orbis I, Merino L, **López J**, Llorente I, García-Vadillo A, Ramirez E, López-Bote JP, Benedí J, Muñoz-Calleja C, Álvaro-Gracia JM, Castañeda S, González-Álvaro I. Experience With the Use of Rituximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in a Tertiary Hospital in Spain: RITAR Study. Journal of clinical rheumatology: practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases. 2018. Epub 2018/07/13. doi: 10.1097/RHU.0000000000000845. PMID: 30001257

Otros artículos en los que ha participado el doctorando.

Adrover JM, Del Fresno C, Crainiciuc G, Cuartero MI, Casanova-Acebes M, Weiss LA, Hueriga-Encabo H, Silvestre-Roig C, Rossaint J, Cossío I, Lechuga-Vieco AV, García-Prieto J, Gómez-Parrizas M, Quintana JA, Ballesteros I, Martín-Salamanca S, Aroca-Crevillen A, Chong SZ, Evrard M, Balabanian K, **López J**, Bidzhekov K, Bachelier F, Abad-Santos F, Muñoz-Calleja C, Zarbock A, Soehnlein O, Weber C, Ng LG, Lopez-Rodriguez C, Sancho D, Moro MA, Ibáñez B, Hidalgo A. A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. Immunity. 2019 Jan 29. pii: S1074-7613(19)30002-0. doi: 10.1016/j.immuni.2019.01.002.

Rituximab induces a lasting, non-cumulative remodelling of the B-cell compartment

J. López¹, L. Merino², L. Piris³, F.S. Herrera², I. Llorente², A. Humbría², A.M. Ortiz², T. Velasco², R. García-Vicuña², S. Castañeda², I. González-Álvaro², C. Muñoz-Calleja¹

¹Immunology Service, ²Rheumatology Service, ³Methodology Unit, Hospital Universitario La Princesa, IIS-IP, Madrid, Spain.

Abstract

Objective

Reconstitution of B-cells after their therapeutic depletion with rituximab mimics the ontogeny of the B-cell lineage in patients with rheumatoid arthritis. However, little is known about the effects of multiple cycles of treatment on the repletion kinetics and their long-lasting effects on the B-cell compartment. We therefore compared the recovery capacity of the B cell subpopulations between patients who experienced their first cycle of rituximab and those who experienced successive cycles.

Methods

The distribution of the different B-cell subsets was characterised by multiparametric flow cytometry in the peripheral blood of 29 patients in the first rituximab course (naïve cycles) and 40 patients in successive cycles. Samples were obtained at baseline and at 3, 6, and 8 months of each cycle.

Results

The baseline percentage of B-cell subsets was similar among successive cycles. Therefore, successive cycles were grouped for comparison with naïve cycles. Patients in naïve cycles had higher percentages at baseline of both total and memory B-cells. However, the recovery of the different B-cell subsets was similar between naïve and successive cycles. In naïve patients the percentage of transitional B-cells significantly correlated with disease activity at baseline.

Conclusion

Rituximab induces a long-term reshape of the B-cell compartment while multiple cycles of rituximab do not induce cumulative effects on B-cell subpopulations. Transitional B-cells seem to be associated with higher disease activity, although further studies are needed to determine if they can be used as a biomarker to predict the need for rituximab retreatment.

Key words

rheumatoid arthritis, B-lymphocytes, rituximab

Jorge López, BSc
 Leticia Merino, MD
 Lorena Piris, Stat.
 Federico S. Herrera, MD
 Irene Llorente, MD
 Alicia Humbría, MD, PhD
 Ana M. Ortiz, MD, PhD
 Teresa Velasco, Nurse
 Rosario García-Vicuña, MD, PhD
 Santos Castañeda, MD, PhD
 Isidoro González-Álvaro, MD, PhD
 Cecilia Muñoz-Calleja, MD, PhD

Please address correspondence
 and reprint requests to:
 Cecilia Muñoz-Calleja or
 Isidoro González-Álvaro,
 Immunology Service Rheumatology
 Service, Hospital Universitario La
 Princesa, IIS-IP, Diego de León 62,
 28006 Madrid, Spain.
 E-mail: isidoro.ga@ser.es
 cmunozc@salud.madrid.org

Received on May 27, 2018; accepted in
 revised form on September 10, 2018.

© Copyright CLINICAL AND
 EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2018.

Funding: this work was supported by
 grants PIE13/00041, RD16/0011/0012,
 PI14/00442, PI12/00494P and PI15/02085
 from the Ministerio de Economía y
 Competitividad (Instituto de Salud Carlos
 III) and co-funded by Fondo Europeo de
 Desarrollo Regional (FEDER).

Competing interests: A.M. Ortiz has
 received personal fees and non-financial
 support from Abbvie and UCB, and
 personal fees from Pfizer, Roche and Lilly,
 not related to this work.

R. García-Vicuña has received funding for
 educational or research grants from MSD,
 Roche, BMS and Lilly; has participated on
 advisory boards for Actelion, BMS, Pfizer,
 Sandoz and Sanofi; has delivered
 presentations sponsored by BMS, Janssen,
 Lilly, Pfizer, Sanofi and Sandoz; has
 received non-financial support from Abbvie,
 BMS, MSD, Pfizer, Sanofi and UCB;
 S. Castañeda has received research support
 from Pfizer, Spain; has received financial
 support for congresses from Abbvie, Amgen,
 BMS, Celgene, MSD, Pfizer, UCB, Gebro,
 Lilly and Roche.

I. González-Álvaro reports grants from
 ISCIII, personal fees from Lilly, grants,
 personal fees and non-financial support
 from UCB, grants from Roche, personal
 fees and non-financial support from BMS,
 Pfizer and Abbvie, non-financial support
 from MSD and Novartis; and has a patent
 issued (PCT-ES2015/070182).

The other co-authors have declared no
 competing interests.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic
 autoimmune disorder characterised by
 chronic synovitis leading to joint dam-
 age and disability, as well as systemic
 manifestations (1). At present, the
 pathogenesis of RA is considered to in-
 involve the interaction of environmental
 factors with a genetically predisposed
 host (2). Recent genetic studies sug-
 gest that pathways related with either
 T-, B-lymphocyte or the innate immune
 system are associated to the risk of de-
 velopment of this disorder (3).

Despite HLA-DR variants account for
 50–60% of the risk of developing RA
 (4), pointing to a T-lymphocyte medi-
 ated disorder, several findings suggest
 that B-cells play also an important role
 in the development and progression of
 RA (5). Among them we can remark
 that auto-reactive B-lymphocytes are
 directly responsible for auto-antibody
 production, and these cells have been
 also involved in pro-inflammatory cy-
 tokine production and antigen presenta-
 tion to T-lymphocytes contributing to
 the activation, differentiation and per-
 sistence of autoreactive T cells (6, 7).
 Immune-modulation with synthetic dis-
 ease-modifying anti-rheumatic drugs
 (sDMARD) is the first line of treatment
 for RA (8). However, when sDMARD
 fail, treatment of RA patients with bio-
 logic DMARD is recommended (8).
 Among them, rituximab (RTX), an anti-
 CD20 monoclonal antibody (mAb) that
 induces B-cell depletion, has proven to
 improve signs and symptoms of RA,
 especially in seropositive forms of the
 disease (9).

RTX administration induces a deple-
 tion of B lymphocyte subsets from pre-
 B-cells to mature B lymphocytes both
 naïve and memory (5). Since pro-B
 lymphocytes and plasma cells do not
 express surface CD20, these cells are
 not depleted by RTX (5). Therefore, B
 cell repopulation is allowed and anti-
 body production is maintained by long-
 life memory plasma cells (5).

Previous studies have analysed the pat-
 tern of peripheral blood B lymphocyte
 repopulation in small populations of
 patients treated with RTX. As expected
 new B-cells belong mainly to imma-
 ture and naïve B-cell subsets (10–12).

However, there is marked heterogene-
 ity in peripheral blood lymphocytes
 subpopulations in the general popula-
 tion (13). Therefore, our objective was
 to determine if there are differences in
 B cell repopulation between patients
 that experience their first RTX cycle of
 treatment and those who have experi-
 enced successive cycles of treatment
 on daily clinical practice. In addition,
 we asked whether successive RTX cy-
 cles induce progressive differences in
 B cell subpopulations.

Material and methods

Patients and study design

This is a prospective study includ-
 ing 69 patients classified as RA ac-
 cording to 1987 American College of
 Rheumatology (ACR) criteria (14) that
 were treated with RTX at our hospital
 from August 2010 to June 2013. We
 collected information from 114 courses
 of RTX treatment, of which 29 corre-
 sponded to the first RTX course (from
 now they are called naïve courses or cy-
 cles). The remaining RTX courses (85
 cycles) corresponded to cycles 2nd to 9th
 and they are called successive cycles.
 Some patients contributed with more
 than one cycle, of which 9 patients
 contributed with their first and 2nd cy-
 cles, and some other patients contrib-
 uted up to 4 cycles. At statistics section
 we provide information on how this
 circumstance was considered in order
 to avoid bias because of over-represen-
 tation of the cases with higher number
 of cycles, as well as whether there was
 an additive effect of RTX treatment.
 Regarding the latter, successive cycles
 were clustered in the following groups:
 2nd and 3rd cycles, 4th and 5th, and 6th or
 higher. This distribution was decided in
 order to get similar number of cycles
 in each group, to avoid statistical prob-
 lems due to underrepresentation of any
 of the groups.

Disease activity at baseline was as-
 sessed through the disease activity score
 calculated with 28 tender and swollen
 joint counts (DAS28), as previously de-
 scribed (15).

RTX treatment

At our hospital there is no fixed protocol
 for RTX use in RA patients and treat-

Peripheral blood samples were obtained in EDTA tubes for cytometry assessment. The schedule of sample collection was as follows: at baseline (T0) immediately previous to RTX infusion and then at 3 (T3), 6 (T6), 8 (T8), 10, 12, 14, 16 and 18 months if there was no previous relapse. The median clinical response duration in our population has been described to be 10 months (16), leading to prescription of a new RTX cycle. Thus, available data gradually decreased beyond month 8 precluding an adequate statistical analysis. Therefore, we decided to censor the data analysis at month 8 since at this visit most patients had started B cell repopulation.

positive cells (cells/ μ L) through staining of 100 μ L of whole peripheral blood with phycoerythrin anti-CD19 mAb (Becton Dickinson [BD], San Jose, CA, USA) in TruCOUNT tubes (BD) that contained a known number of fluorescent beads by comparing cellular events to beads events with the software Infinicyt (Cytognos, Salamanca, Spain). When samples had more than 5 B-cells/ μ L, a further immunophenotypic characterisation of the B cell subpopulations was performed using the following mAbs: anti-CD45 (Horizon V500), anti-human IgM (Allophycocyanin [APC]), anti-CD38 (APC), anti-CCR6 (Phycoerythrin [PE]), anti-CD21 (PE), anti-CD27 (peridinin chlorophyll protein [PerCP]–Cy5.5), anti-CD19 (PE–Cy7), anti-human IgD (fluorescein isothiocyanate [FITC]), anti-CD24 (FITC), anti-CD10 (APC–H7), anti-CD38

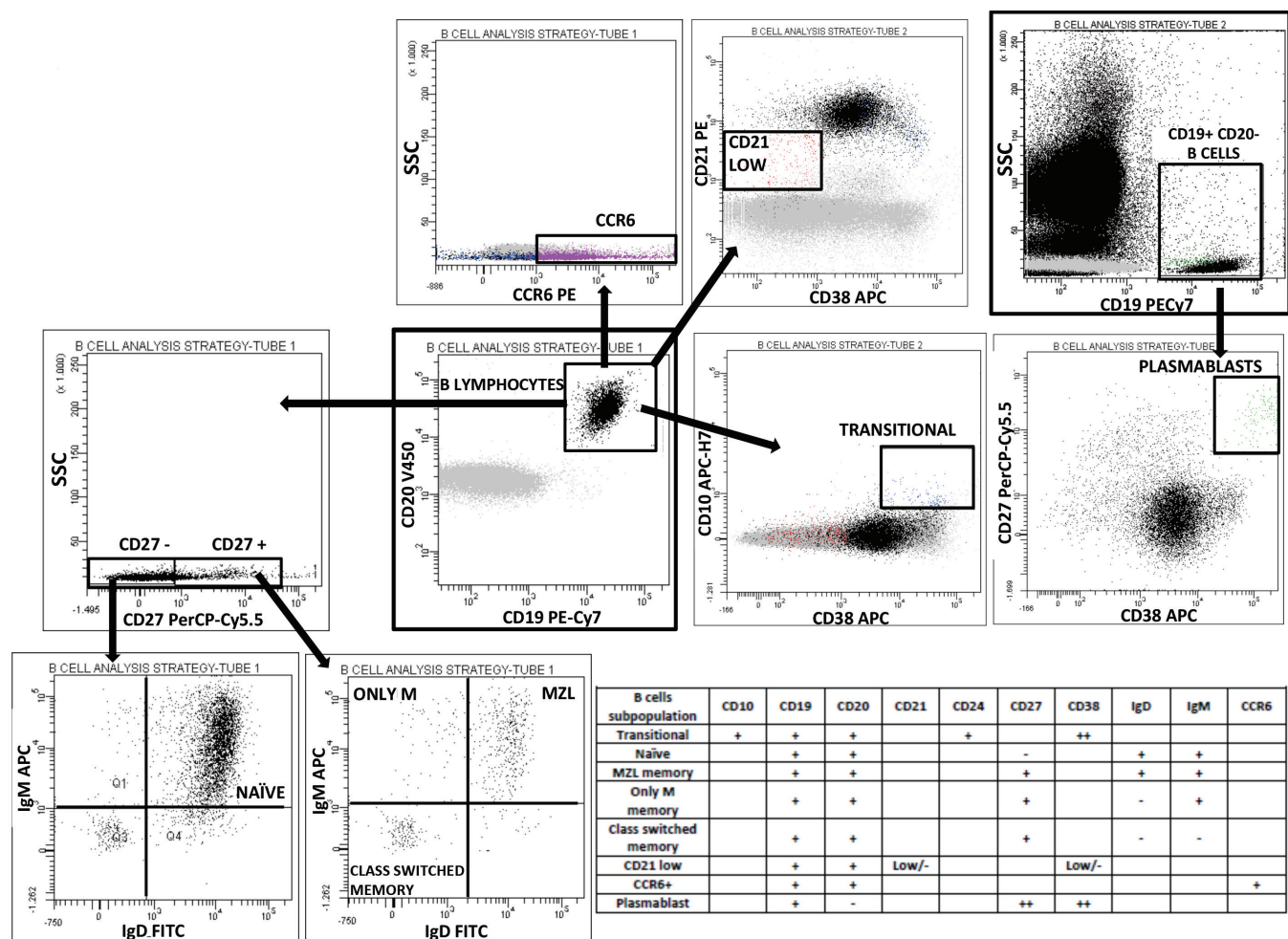


Fig. 1. Gating strategy used for the identification of B-cell subpopulations according to their maturation stage. Bivariate dot-plot graphical representations are shown of the gating strategy used to identify transitional, naïve, marginal zone like, class-switched memory B-cells and plasma cells, according to their pattern of expression of the molecules shown in the table and their side-scatter (SSC) features.

(APC-H7) from BD and anti-CD20 Pacific Blue from BioLegend.

Samples were incubated for 15 minutes at room temperature with the respective mAb. Then erythrocytes were lysed with FACS lysis solution (BD) for 10 minutes and after washing with phosphate buffered saline, samples were analysed in a FACS Canto II device (BD). At least 100,000 cells were collected and data were analysed with the FACSDiva Software (BD). B cell subpopulations were assigned according to the strategy shown in Figure 1.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Stata v. 13.1 (StataCorp, College Station, TX, USA).

Quantitative variables were represented as the mean \pm standard deviation (SD), since total n was higher than 30 and most of variables fulfilled the homoscedasticity criteria assessed by Levene's test. Differences in these variables were analysed using the Student's *t*-test (successive vs. naïve). When multiple groups existed (different number of successive cycles), they were analysed with the *nptrend* command of Stata that performs the Cuzick's non-parametric test for trend across ordered groups. Categorical variables were expressed as percentages and significance levels between groups were established using the χ^2 test or the Fisher's exact test.

For the statistical analysis of B-cell subpopulations only baseline and 8 month visits were used, since few patients had repopulated at the 3- and 6-month visits. Student's *t*-test was used and since multiple comparisons were performed, the significance threshold was set at $p < 0.005$, according to Bonferroni correction. In addition, considering that we studied repeated measurements (different rituximab cycles) for each patient, a sensitivity analysis was performed using population-averaged panel-data models through the command *xtgee* of Stata. This command allows fitting analysis using generalised estimation equations nested by patient and cycle to adjust for repeated measurements. This approach yielded almost same results than with Student's *t*-test (data not shown).

Table I. Characteristics of the patients according to rituximab cycle groups.

	Naïve cycles (29)	Successive cycles (85)		
		2 nd and 3 rd (28)	4 th and 5 th (32)	6 th or higher (55)
Female gender	26 (90)	25 (89)	28 (87.5)	21 (84)
Age at disease onset (years)	48.5 \pm 15.5	50.9 \pm 12.4	45.0 \pm 9.7	47.7 \pm 13.3
Disease duration (years)	12.0 \pm 8.7	13.1 \pm 6.8	14.0 \pm 6.8	16.8 \pm 6.9
Rheumatoid factor positive	28 (96.5)	28 (100)	30 (94)	23 (92)
DAS28 at baseline	5.1 \pm 1.3	4.9 \pm 0.9	4.8 \pm 1.3	4.6 \pm 1.0

DAS28: disease activity score calculated with 28 joint count (15). Data are shown as mean \pm standard deviation or total number (percentage).

Pearson's test was used to analyse the correlation between disease activity and baseline B-cell subpopulations.

Ethical statements

This is an analysis of a subpopulation of RITuximab en Artritis Reumatoide (RITAR) study that was conducted according to the principles expressed in the Helsinki Declaration of 1983. RITAR was considered by the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices (AEMPS) as an observational study (EPA-OD) and it was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Universitario La Princesa (code no. 2903A), that did not consider necessary to ask for the written consent of patients. Nevertheless, patients were informed about the study, and verbal consent was obtained.

Results

Rituximab does not induce cumulative effects on peripheral B lymphocyte subpopulations

Before comparing naïve cycles with successive cycles, we studied whether RTX induces cumulative changes in B cell subpopulations in the latter group. Thus, we compared baseline data from patients receiving their successive cycles clustered at the 3 groups described in Table I. As it is shown in Figure 2, we did not observe significant differences in the percentage of the different B cell subpopulations among the 3 groups. The only exception was a non-significant trend to lower percentage of plasmablasts with increasing number of administered RTX cycles. Therefore, we decided to consider all the successive cycles as one group for the subsequent analyses.

Baseline differences in peripheral B lymphocyte subpopulations between naïve and successive patients

As expected, at baseline those patients studied in successive cycles showed significantly lower total B-cells percentages than naïve patients (Fig. 3, upper panel; time=0).

Regarding the percentage of B-cell subpopulations at baseline, patients in naïve cycles showed significantly higher percentages of memory mature B-cells, as well as their subsets: marginal-zone-like B-cells, Class switched B-cells and only M memory B-cells (Fig. 3, 2nd and 3rd rows of panels). By contrast, naïve patients showed significantly lower percentages of transitional B-cells and no significant difference in the percentages of naïve mature B-cells (Fig. 3, left and middle panels of 2nd row). There were no differences in the percentage of plasmablasts and there was a trend to higher percentage of CD21 low and CCR6+ B-cells in peripheral blood of patients at naïve cycles (Fig. 3, 4th row).

Follow-up differences in peripheral B lymphocyte subpopulations between naïve and successive cycles

At the 3-month visit, we observed that 3 patients did not achieve a complete B-cell depletion, one of them after two 2000 mg RTX cycle and the other two patients after 1000 mg RTX cycle.

As previously described (5), the rate of repopulation was heterogeneous starting at 6 months in 20.8% of cases; 55% of patients repopulated at 8 months, 80% at 10 months and almost all patients at 12 months. There were no significant differences in the rate of repopulation between naïve and successive cycles (Fig. 3, upper panel).

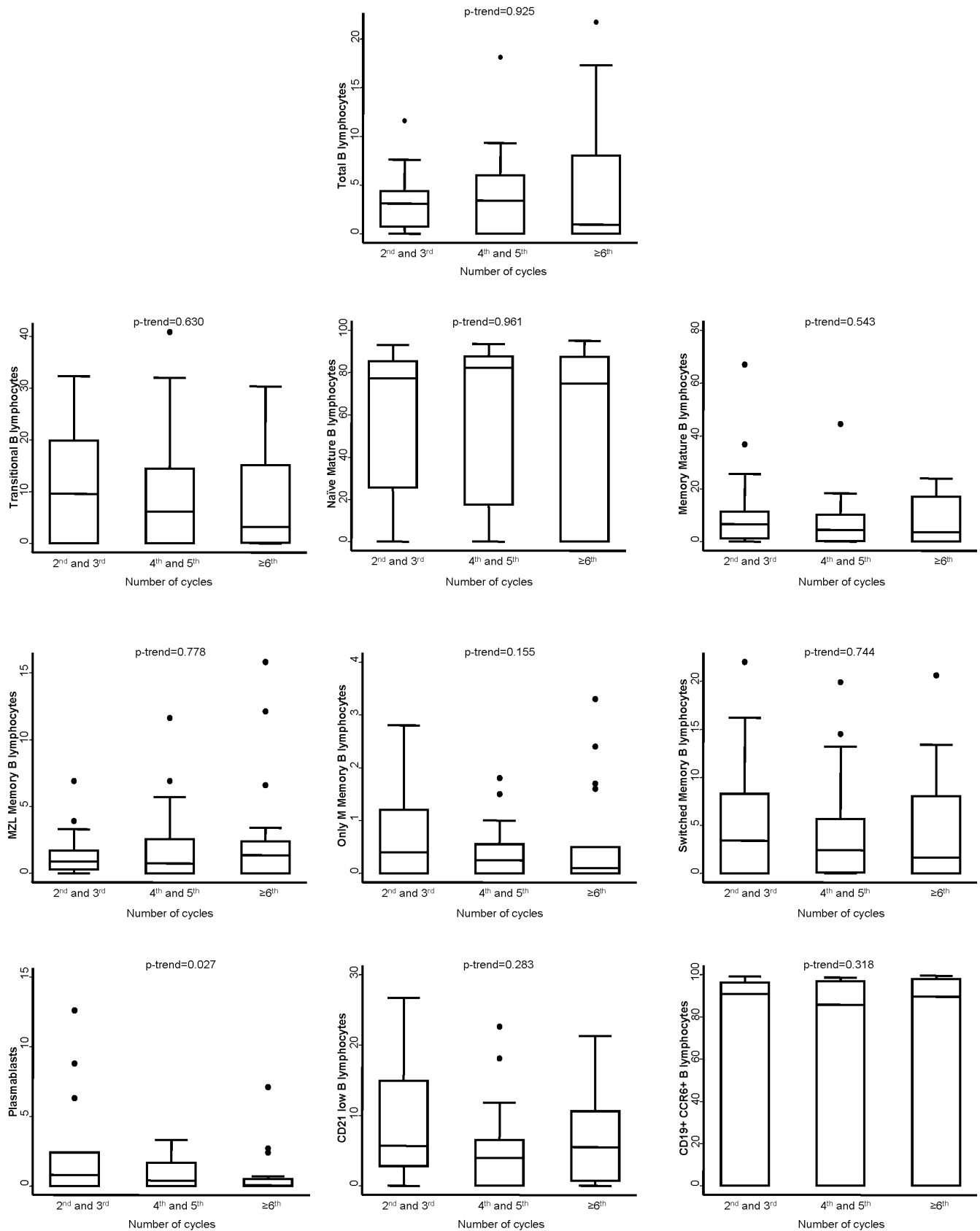


Fig. 2. Differences in B cell subpopulations at baseline visit among patients that had received 2 or more cycles of rituximab. Data represent percentage respect to total lymphocytes in the first row of panels or percentage respect to B lymphocytes in all other panels. Data are shown as interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), p95 (line above the box) and p5 (line below the box). MZL: Marginal zone like. The Cuzick's test for trend was used to determine statistical significance that was set to $p\text{-trend} < 0.005$ due to multiple comparisons, according to Bonferroni correction.

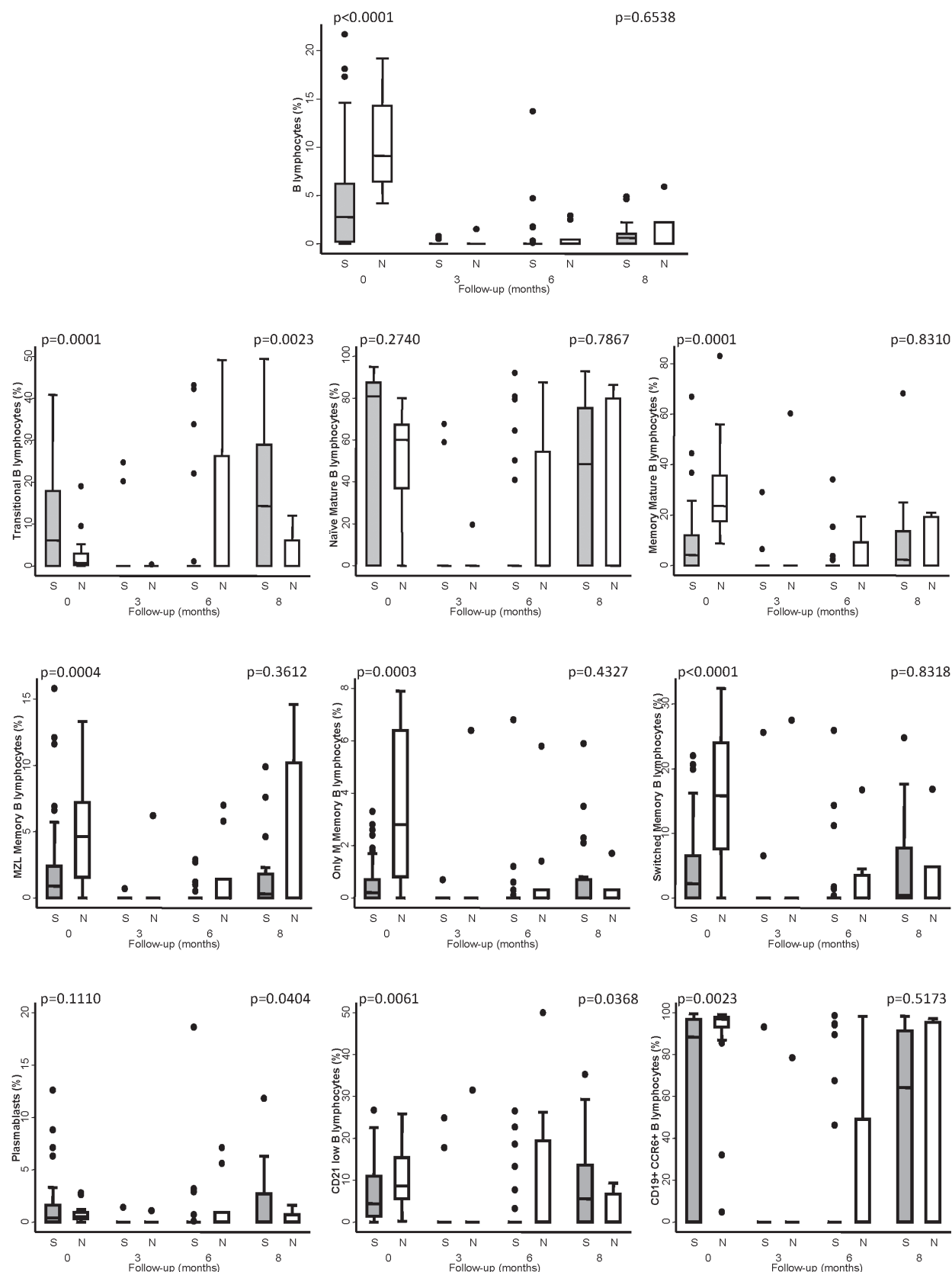


Fig. 3. Comparison of B cell subsets at baseline and repopulation between naive (N) and successive (S) patients undergoing rituximab treatment. Data represent percentage respect to total lymphocytes in the first row of panels, or percentage respect to B lymphocytes in all other panels. Data are shown as interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), p95 (line above the box) and p5 (line below the box). MZL: Marginal zone like. Statistical analysis was performed at the baseline and 8-month visits when enough data were available (most patients were B-cell depleted at the 3- and 6-month visits) using Student's *t*-test. Significance threshold was set at $p<0.005$ due to multiple comparisons, according to Bonferroni correction.

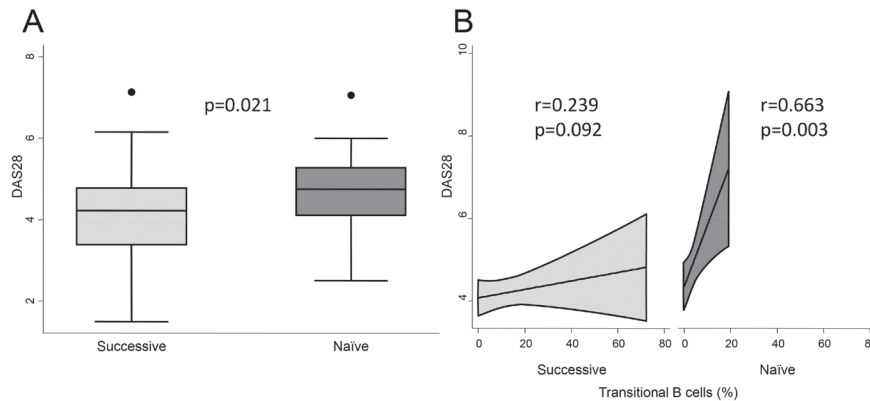


Fig. 4. Transitional B-cells correlate with disease activity in patients with rheumatoid arthritis.

A: Baseline disease activity in patients undergoing their first rituximab cycle (naïve patients, dark grey boxes) or successive (light grey boxes) rituximab cycle. Data are shown as interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), p95 (line above the box) and p5 (line below the box) of DAS28. Dots represent outliers. Statistical analysis used was Student's *t*-test. Significance threshold was set at $p < 0.05$. **B:** Association between disease activity and percentage of transitional B-cell at baseline. Data are shown as the linear correlations (solid red line) and their respective 95% confidence intervals (grey areas) for successive cycles (left panel) and naïve cycles (right panel). The ρ -coefficient and *p*-level were estimated with the Pearson's test and statistical significance was set at p -level < 0.005 due to multiple comparisons (the complete set of panels justifying this adjustment is shown in Supplementary Fig. 1).

At the 8-month visit, we did not observe differences in most B-cell subpopulations, except for a slightly significant lower percentage of transitional B-cells in patients at their first RTX cycle, that probably is not clinically relevant since at the sixth month the percentage of transitional B-cells was higher in those patients compared to patients receiving successive RTX cycles (Fig. 3, left panel, 2nd row).

Disease activity and B lymphocyte subpopulations

At baseline visit, naïve patients showed significantly more intense disease activity than successive patients (Fig. 4A). Since there were significant differences in several B cell subpopulations at baseline between naïve and successive patients, we studied whether there was any association at baseline between B-cells subpopulations and disease activity. The percentage of transitional B-cells in naïve patients was significantly associated with increased levels of disease activity at baseline (Fig. 4B). In addition, there was a similar trend to significance in successive patients. None of the other subpopulations showed association with disease activity at baseline (Suppl. Fig. 1).

Discussion

Depletion of B-cells by anti-CD20 antibodies like RTX is efficacious in patients with RA (8) and other autoimmune dis-

eases, such as ANCA-associated vasculitis (17, 18) or idiopathic thrombocytopenic purpura (19), underscoring that relevant T-cell driven mechanisms in several autoimmune diseases are B cell dependent. However, both the depletion of B lymphocytes and its therapeutic benefit are transient in most patients since RTX targets the CD20 molecule, which is only expressed by mature B-cells. In addition, B-cell reconstitution after depletion with rituximab usually coincides with a new outbreak of the disease, especially in RA (5).

In this study, we found that successive RTX cycles do not induce a cumulative effect in the percentage of the different B-cell subsets, indicating that B-cell reconstitution always follows a similar pattern after each cycle. We only observed a non-significant tendency to lower percentage of plasmablasts in those patients with a higher number of RTX cycles (Fig. 2, lower row, left panel). Since it has been previously reported that detection of plasmablasts could be associated with disease relapse (10, 11, 20), and best responders are those who received higher number of RTX cycles, it could be argued that plasmablast percentages may decrease with higher number of RTX cycles. However, this was not consistent with the finding of a trend to higher proportion of plasmablasts, either at baseline or after repopulation at

month 8, in patients that received successive cycles compared to naïve patients (Fig. 3, left panel, lower row).

Altogether, our data support previous studies on how B-cells repopulate peripheral blood after depletion with RTX (10, 11, 21). Furthermore, our study gives insight into this topic by including a higher number of reconstitution patterns following B-cell depletion with RTX and analysing a wider array of B-cell subpopulations. As expected, independently on whether the patient has received his/her first or successive RTX cycle, repopulation usually starts after 6–8 months of RTX administration with naïve B-cells. Therefore, at this time treated patients show significantly lower percentages of memory B-cells and higher percentages of naïve B-cells than patients before their first RTX cycle. However, after 8 months of RTX treatment no significant differences are observed between both groups, even among the different subpopulations of memory B-cells (non-switched, only M or switched). This pattern of reconstitution could also be observed by our group in other settings such as bone marrow transplantation (22). Therefore, it constitutes a common synchronised pattern of immune reconstitution after B-cell depletion. The only significant difference found was that patients at their first RTX cycle had significantly lower proportion of transitional B-cells both at baseline and after 8 months of RTX treatment. This finding suggests that immature B-lymphocytes tend to migrate from bone marrow earlier in patients that have experienced successive previous B-cell depletion cycles.

On the other hand, we were interested in studying the effect of RTX in two subpopulations not previously studied: CD21⁺ and CCR6⁺ B-lymphocytes. The percentage of baseline CD21⁺ B lymphocytes was higher in patients that had never been exposed to RTX compared to those in successive cycles. This subpopulation of B-lymphocytes is increased in patients with autoimmune disorders and it is an efficient antigen presenting cell to T-lymphocytes (23). Therefore, decreasing CD21⁺ B-cells could be added to the proposed RTX mechanisms of action in RA. Accordingly, we observed

that disease activity at baseline is lower in patients receiving successive RTX cycles compared with naïve patients (Fig. 4A). However, the design of our study does not allow determining whether the lower percentage of CD21⁺ B-cells in RTX experienced patients is the cause or the consequence of lower disease activity. Furthermore, no correlation was observed between the frequency of this subpopulation and disease activity either in successive or naïve cycles (Suppl. Fig. 1). Regarding CCR6⁺ B-cells, we observed a significantly lower percentage of these cells in RTX experienced patients at the baseline visit of their successive RTX cycles compared to naïve patients. CCR6 expression in memory B-cells is essential to develop a recall response to their specific antigen, since the lack of this molecule seems to prevent a colocalisation with CD4⁺ T cells at the lymphoid follicles (24, 25). In addition, CCR6 and its ligand CCL20 have been involved in the induction of pre-B-cells growth (26). The only subpopulation that shows an association with disease activity is transitional B-cells, which could be in accordance with the higher number of self-reactive B-cells among the circulating peripheral new bone marrow emigrants (27). The clearest correlation was observed in RTX naïve patients and a less clear association in patients receiving successive RTX cycles (Fig. 4B). A previous study suggested that treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs can decrease the percentage of these cells, although it lacked an analysis of their correlation with disease activity (28). Further studies will be needed to determine whether monitoring this B-cell subpopulation could predict clinical relapse and, therefore, the need of a new RTX infusion.

The main limitation of our study is that we did not collect enough information to determine whether the changes in B-cell subpopulations were related with response to RTX, since most of the patients studied were in their successive cycles meaning that they were responders and the proportion of non-responders in naïve cycles was too low to allow such analysis. In summary, our findings support previous studies suggesting that repopulation of B-cells after depletion with RTX

always follows a synchronised pattern with no additive effects on the different subpopulations studied. On the other hand, our data point to a role of CD21^{low} B-cells, CCR6⁺ B-cells and transitional B-cells as the real therapeutic targets of B cell depletion in RA, which warrants further studies.

Acknowledgements

Special thanks to Manuel Gomez-Gutierrez for writing assistance.

References

- SCOTT DL, WOLFE F, HUIZINGA TW: Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376: 1094-108.
- MALMSTROM V, CATRINA AI, KLARESKOG L: The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol* 2017; 17: 60-75.
- OKADA Y, WU D, TRYNKAG *et al.*: Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014; 506: 376-81.
- JIANG X, FRISELLI T, ASKLING J *et al.*: To what extent is the familial risk of rheumatoid arthritis explained by established rheumatoid arthritis risk factors? *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 352-62.
- CAMBRIDGE G, TORRE IDE L: Response to rituximab: has the original hypothesis been confirmed? *Curr Pharm Des* 2015; 21: 212-20.
- TAKEMURA S, KLIMIUK PA, BRAUN A, GORONZY JJ, WEYAND CM: T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 2001; 167: 4710-8.
- KUIPERS TW, BENDE RJ, BAARS PA *et al.*: CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* 2010; 120: 214-22.
- SMOLEN JS, LANDEWÉ R, BIJLSMA J *et al.*: EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 969-77.
- ISAACS JD, COHEN SB, EMERY P *et al.*: Effect of baseline rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibody serotype on rituximab clinical response: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 329-36.
- LEANDRO MJ, CAMBRIDGE G, EHRENSTEIN MR, EDWARDS JC: Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 613-20.
- ROLL P, PALANICHAMY A, KNEITZ C, DORNER T, TONY HP: Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2377-86.
- ROLL P, DORNER T, TONY HP: Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1566-75.
- WARNATZ K, SCHLESIER M: Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74: 261-71.
- ARNETT FC, EDWORTHY SM, BLOCH DA *et al.*: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
- PREVOO ML, VAN'T HOF MA, KUPER HH, VAN LEEUWEN MA, VAN DE PUTTE LB, VAN RIEL PL: Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 44-8.
- CAÑAMARES-ORBIS I, MERINO L, LOPEZ J, LLORENTE I *et al.*: Experience with the use of rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis in a tertiary hospital in Spain: RITAR Study. *J Clin Rheumatol* 2018.
- GUILLEVIN L, PAGNOUX C, KARRAS A *et al.*: Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2014; 371: 1771-80.
- SPECKS U, MERKEL PA, SEO P *et al.*: Efficacy of remission-induction regimens for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2013; 369: 417-27.
- AUGER S, DUNY Y, ROSSI JF, QUITTET P: Rituximab before splenectomy in adults with primary idiopathic thrombocytopenic purpura: a meta-analysis. *Br J Haematol* 2012; 158: 386-98.
- MOLLER B, AEBERLI D, EGGLI S *et al.*: Class-switched B cells display response to therapeutic B-cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R62.
- LEANDRO MJ, COOPER N, CAMBRIDGE G, EHRENSTEIN MR, EDWARDS JC: Bone marrow B-lineage cells in patients with rheumatoid arthritis following rituximab therapy. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 29-36.
- ARTECHE-LOPEZ A, KREUTZMAN A, ALEGRE A *et al.*: Multiple myeloma patients in long-term complete response after autologous stem cell transplantation express a particular immune signature with potential prognostic implication. *Bone Marrow Transplant* 2017; 52: 832-8.
- SHIMABUKURO-VORNHAGEN A, GARCIA-MARQUEZ M, FISCHER RN *et al.*: Antigen-presenting human B cells are expanded in inflammatory conditions. *J Leukoc Biol* 2017; 101: 577-87.
- ELGUETA R, MARKS E, NOWAK E *et al.*: CCR6-dependent positioning of memory B cells is essential for their ability to mount a recall response to antigen. *J Immunol* 2015; 194: 505-13.
- REIMER D, LEE AY, BANNAN J *et al.*: Early CCR6 expression on B cells modulates germinal centre kinetics and efficient antibody responses. *Immunol Cell Biol* 2017; 95: 33-41.
- TSURUYAMA T, HIRATSUKA T, AINI W, NAKAMURA T: STAT5A Modulates chemokine receptor CCR6 expression and enhances pre-B cell growth in a CCL20-dependent manner. *J Cell Biochem* 2016; 117: 2630-42.
- WARDEMANN H, NUSSENZWEIG MC: B-cell self-tolerance in humans. *Adv Immunol* 2007; 95: 83-110.
- MCCOMISH J, MUNDY J, SULLIVAN T, PROUDMAN SM, HISSARIA P: Changes in peripheral blood B cell subsets at diagnosis and after treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis: correlation with clinical and laboratory parameters. *Int J Rheum Dis* 2015; 18: 421-32.

OPEN

Experience With the Use of Rituximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in a Tertiary Hospital in Spain

RITAR Study

Iciar Cañamares-Orbis, PharmD,* Leticia Merino, MD,† Jorge López, MSc,‡ Irene Llorente, MD,† Alberto García-Vadillo, MD, PhD,† Esther Ramirez, PharmD, PhD,* Juan Pedro López-Bote, MD, PhD,† Juana Benedí, PharmD, PhD,§ Cecilia Muñoz-Calleja, MD, PhD,‡ José M. Álvaro-Gracia, MD,† Santos Castañeda, MD, PhD,† and Isidoro González-Álvaro, MD, PhD†

Background/Objective: There is evidence supporting that there are no relevant clinical differences between dosing rituximab 1000 mg or 2000 mg per cycle in rheumatoid arthritis (RA) patients in clinical trials, and low-dose cycles seem to have a better safety profile. Our objective was to describe the pattern of use of rituximab in real-life practice conditions.

From the *Department of Pharmacy, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain; †Department of Rheumatology, Hospital Universitario La Princesa, IIS-IP, Madrid, Spain; ‡Department of Immunology, Hospital Universitario La Princesa, IIS-IP, Madrid, Spain; and §Department of Pharmacology, Pharmacognosy and Botany Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

Conflicts of interest and sources of funding: I.C., L.M., J.L., I.L., E.R.H., J.B., and C.M. have nothing to disclose. A.G.V. reports personal nonfinancial support from Lilly and Pfizer. J.M.A.G. reports personal fees from Abbvie; personal fees and nonfinancial support from Bristol-Myers Squibb; personal fees and nonfinancial support from Merck Sharp & Dohme; grants, personal fees, and nonfinancial support from Roche; grants and personal fees from UCB; personal fees and nonfinancial support from Pfizer; personal fees and nonfinancial support from Lilly; personal fees from Sanofi; personal fees from Janssen-Cilag; and personal fees from Novartis, outside the submitted work. S.C. reports grants from Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III, PI12/01578) and grants from Pfizer España during the course of the study; personal fees from Abbvie; personal fees from Amgen; personal fees from Bristol-Myers Squibb; personal fees from Gebro Pharma; personal fees from Lilly; personal fees from Merck Sharp & Dohme; personal fees from Pfizer; and personal fees from Roche, outside the submitted work. I.G.Á. reports grants from Instituto de Salud Carlos III, during the course of the study; personal fees from Lilly; grants, personal fees, and nonfinancial support from UCB; personal fees and nonfinancial support from Bristol-Myers Squibb; personal fees and nonfinancial support from Pfizer; grants from Roche; personal fees and nonfinancial support from Abbvie; and nonfinancial support from Merck Sharp & Dohme, outside the submitted work; in addition, he also has a patent PCT/ES2015/070182 issued. Our manuscript was supported by grants RD16/0012/0011 and PI14/00442 from the Ministerio de Economía y Competitividad (Instituto de Salud Carlos III) and cofunded by the European Regional Development Fund.

I.C.-O. is now currently working as pharmacist in Direction of Pharmaceutical Management, Autonomous Community of Madrid, Madrid, Spain. L.M. is now currently affiliated with the Rheumatology Department, Hospital San Pedro, Logroño, Spain. J.L. is now currently affiliated with the Centro de Estudios y Desarrollos Sanitarios CEyDES, Zaragoza, Spain and Centro de Análisis Genéticos Citogen, Zaragoza, Spain.

Correspondence: Iciar Cañamares-Orbis, PharmD, Direction of Pharmaceutical Management, Autonomous Community of Madrid, Spain, Plaza Carlos Trias Bertran 7, 5th floor. 28020 Madrid, Spain. E-mail: iciar.canamares@salud.madrid.org.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citation appears in the printed text and is provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.jclinrheum.com).

Copyright © 2018 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

ISSN: 1076-1608

DOI: 10.1097/RHU.0000000000000845

Methods: Rituximab for RA in clinical practice (RITAR) study is a retrospective cohort study from 2005 to 2015. Eligibility criteria were RA adults treated with rituximab for active articular disease. Response duration was the main outcome defined as months elapsed from the date of rituximab first infusion to the date of flare. A multivariable analysis was performed to determine the variables associated with response duration.

Results: A total of 114 patients and 409 cycles were described, 93.0% seropositive and 80.7% women. Rituximab was mainly used as second-line biological therapy. On demand retreatment was used in 94.6% of cases versus fixed 6 months retreatment in 5.4%. Median response duration to on demand rituximab cycles was 10 months (interquartile range, 7–13). Multivariable analysis showed that age older than 65 years, number of rituximab cycles, seropositivity, and first- or second-line therapy were associated with longer response duration. The dose administered at each cycle was not significantly associated with response duration.

Conclusions: Our experience suggests that 1000 mg rituximab single infusion on demand is a reasonable schedule for long-term treatment of those patients with good response after the first cycles, especially in seropositive patients and when it is applied as a first- or second-line biological therapy.

Key Words: rheumatoid arthritis, rituximab, observational study

(*J Clin Rheumatol* 2018;00: 00–00)

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease with a heterogeneous genetic background whose pathogenesis involves different cells of the immune system. Rituximab is a B-lymphocyte depleting monoclonal antibody that was approved for RA treatment in Europe in 2006. The approved indication in this disorder is as a second-line biological therapy, which is for patients who have had an inadequate response or intolerance to 1 or more tumor necrosis factor (TNF) inhibitor therapies, if possible in combination with methotrexate (MTX). Nevertheless, EULAR recommendations for RA management, as well as other consensus documents, suggest that rituximab can be used as a first-line biological therapy under certain circumstances.^{1,2}

The schedule of rituximab retreatment administration remains controversial. The summary of product characteristics suggests that for RA 2 intravenous infusions of 1000 mg, on days 1 and 15, should be administered and then treatment can be repeated after 24 weeks. This ambiguous statement is the consequence of early pivotal studies exploring both fixed retreatment and on demand schedules.³

Current evidence from clinical trials and registries challenges the existence of relevant efficacy differences between dosing rituximab 1000 mg or 2000 mg per cycle, and the low-dose schedule seems to have a better safety profile in terms of immunoglobulin G count.^{4–6} In addition, rituximab is more effective in RA patients seropositive for rheumatoid factor (RF) or anticitrullinated protein antibodies (ACPAs).^{7,8} Considering these findings, the Spanish Rheumatology Society and Hospital Pharmacy Society

Consensus for biologics optimization recommended the use of 1000 mg rituximab cycles on demand retreatment and preferentially in RF or/and ACPA-seropositive patients.⁹

The rituximab for RA in clinical practice (RITAR) study objective was to describe the pattern of use of rituximab in real-life practice conditions over 11 years in our hospital. In addition, we collected information about clinical response duration in those cycles prescribed on demand to identify factors associated with this outcome.

METHODS

Patients

RITAR is a retrospective, open-label, observational cohort study that describes the patterns of use of rituximab in a tertiary university hospital in Madrid, Spain, from 2005 to 2014 and a follow-up period that covered until December 2015.

Eligibility criteria were RA adults treated with at least 1 rituximab infusion for articular active disease. Patients were identified from the Hospital Pharmacy Department database, and clinical charts were reviewed to confirm the RA diagnosis according to the American College of Rheumatology 1987 criteria.¹⁰ Patients that did not fulfill the criteria, those having a history of another autoimmune disease or RA patients in which rituximab was prescribed because of systemic complications, were excluded from the study. Those rituximab cycles that were lost from follow-up and those cycles administered under a clinical trial protocol were also excluded.

Data were retrospectively collected from our electronic medical record software. During the study period and follow-up, treatment decisions were taken under daily clinical practice criteria. Patients treated with on demand RTX cycles have scheduled visits at 3, 6, 8, 10, 12, and 14 months to early detect relapses. Some of these visits are conducted by our specialized nurse. Patients have also the possibility to contact the nurse by phone if they feel they are relapsing, and then the nurse can provide them with an extra appointment with the responsible physician.

RA Activity Measurements

DAS28 (disease activity score based on a 28-joint count) was systematically registered at the time of rituximab infusion (baseline visit of each cycle). However, because this is a retrospective noninterventive study, some data required to assess disease activity with objective measures (ie, DAS28) were missing in subsequent follow-up visits. Response duration was defined as the time (in months) elapsed from the date of the first rituximab infusion to the date of flaring (DAS28 > 3.2) recorded in the clinical chart. In those cases in which there was no information on the date of flare, the date of the next rituximab administration was used as the flare date. Ineffectiveness was considered if the physician in charge of the patient described absence of improvement of disease activity or improvement lasting for less than 4 months. Information about effectiveness was obtained from the data and commentaries in the clinical chart.

Study Variables

For each rituximab cycle, we collected number of cycle, rituximab dose per cycle (1000 mg or 2000 mg), retreatment schedule (fixed retreatment every 6 months or on demand), concomitant disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), and number of previous biological therapies. In case of rituximab discontinuation, the reason for it was also collected (lack of effectiveness, adverse reactions, and others). In addition, we recorded patient RF or/and ACPA status at baseline.

Additional Variables

Baseline characteristics of the patients were recorded, including demographic characteristics (sex, age at disease onset, age at rituximab start) and presence of comorbidities (chronic obstructive pulmonary disease, congestive heart disease, depression, diabetes mellitus, gastric ulcer, hypercholesterolemia, hypertension, ischemic heart disease, osteoporosis, stroke, solid, or hematological neoplasms), shown in Supplemental Digital Content Table 1, <http://links.lww.com/RHU/A126>, with patient's comorbidities, and RA systemic and extra-articular manifestations (amyloidosis, atlantoaxial luxation, episcleritis, Felty syndrome, lung disease, rheumatoid vasculitis, serositis, Sjögren syndrome) shown in Supplemental Digital Content Table 2, <http://links.lww.com/RHU/A127>, with complications associated to RA.

Concomitant DMARDs, previous nonbiological and biological DMARDs, were also recorded including their biological line number, dates of onset and withdrawal, as well as the main reason for discontinuation (lack or loss of effectiveness, adverse reactions, others). Glucocorticoids and nonsteroid anti-inflammatory drugs, intra-articular and periarticular glucocorticoid infiltrations, and other concomitant treatments are frequently used but were not registered.

Ethical Statements

RITAR study was conducted according to the principles expressed in the Helsinki Declaration of 1983. RITAR was considered by the Spanish Agency of Medicines and Medical Devices as an observational study, and it was approved by the Research Ethics Committee of Hospital Universitario La Princesa (code number 2903A), which did not consider necessary to ask for the written consent of patients. Nevertheless, patients that continued their follow-up at the Rheumatology Department were informed about the study, and verbal consent was obtained.

Statistical Analysis

For the description of the population means \pm standard deviation (SD), medians and interquartile range (IQR) and absolute and relative frequencies were used depending on the distribution of variables. Student *t* test was used for continuous variables with normal distribution. Discrete variables or those continuous not normally distributed were analyzed with the Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis test, if more than 2 categories existed. Categorical variables were analyzed with the χ^2 test or Fisher test when any expected frequency was lower than 1, or when 20% of the expected frequencies were 5 or less.

To determine which variables were associated with response duration, and considering that we studied repeated measurements (different rituximab cycles) for each patient, a multivariable analysis using population-averaged panel data models through the command *xtgee* of Stata was used. This command allows fitting multivariable analysis using generalized estimation equations nested by patient and cycle to adjust for repeated measurements. Adding all variables with a *P* value less than 0.15 in the bivariate analysis performed the first model. The final model was constructed through backward stepwise method removing all variables with *P* greater than 0.15 and also considering quasi-likelihood estimation based on the independence model information criterion and Wald tests.¹¹ In addition, to estimate the average response duration of 1000 mg and 2000 mg rituximab cycles, we forced this variable in the final model, and then the adjusted mean \pm standard error were estimated with the *xtgee* postestimation command *margins*. Statistical analyses were performed using the statistical package Stata v. 12.

RESULTS

Patients

One hundred sixty-one patients were treated with rituximab. Eighteen patients treated under other diagnoses different from RA, 8 patients in whom rituximab was prescribed because of RA systemic manifestations, and 21 patients who were not followed up in our hospital after the first rituximab infusion were excluded. In addition, those rituximab cycles that belonged to clinical trials or were lost during follow-up were excluded from the analysis. Finally, 114 patients were included and 409 rituximab cycles were described. Median follow-up was 2.95 years (IQR, 1.24–5.54).

Age at rituximab start was 60 years (IQR, 51–69) and disease duration was 11 years (IQR, 6–16). Most patients experienced seropositive disease (93%) and 80.7% of them were women. Because, after approval of rituximab, new biological therapies became available for RA treatment, we decided to cluster patients in 3 groups considering the year of rituximab start (before 2009, 2009–2011, and 2012–2014). As it is shown in Table 1, patients treated with rituximab before 2009 were younger and seronegative cases were more frequent. In addition, those treated after 2012 tended to suffer less comorbidities ($P = 0.018$) and systemic complications ($P = 0.119$). No differences were observed in terms of previous DMARDs, biological therapies, or disease activity at the beginning of treatment.

Patterns of Rituximab Use

As it is shown in Table 1, rituximab was mainly used as second-line biological therapy. Nevertheless, rituximab was the first biological treatment in 19.3% of overall cases, with tendency to be less frequent since 2012 and more common among those patients who received more rituximab cycles (Table 1). Previous therapies to rituximab treatment start are shown in Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/RHU/A112>. Median number of rituximab cycles per patient was 3 (IQR, 2–6), ranging from 1 to 11.

On demand retreatment schedule was used in 94.6% of total rituximab cycles versus fixed retreatment every 6 months in 5.4%. Rituximab fixed retreatment was more frequent during the first years of rituximab use in our center (until 2008 12% of cycles), but this pattern of use gradually decreased (7.9% of cycles 2009–2011) and disappeared after 2012. In addition, fixed retreatment schedule was more common in the initial courses of treatment reaching 12.5% at first cycle, 6.9% at second, 3.3% at third, and 2.0% at fourth or later. For those patients receiving 5 or more cycles, the on demand schedule was always used.

Rituximab dose was 1×1000 mg in 31.8% of total cycles. There were no relevant differences in the percentage of 1000 mg and 2000 mg cycles over time ($P = 0.151$). However, we observed that the use of 1×1000 mg cycles was significantly more frequent in cycle 3 or successive (45%) compared with the 2 first cycles (17%; $P < 0.001$). Specifically, in 91.5% of first rituximab cycles dose was 2000 mg. Then, the use of rituximab 1000 mg per cycle gradually increased up to 80% to 100% in those patients with more than 6 cycles.

Rituximab was used without concomitant DMARDs in 12.2% of patients, and the use as monotherapy gradually increased over time (Table 2). Regarding concomitant DMARD treatment, the most frequent was MTX (53.8%), followed by leflunomide (36.7%), hydroxychloroquine (7.6%), sulfasalazine (2.9%), and others (azathioprine and cyclosporine, 7.6%). In 16.2% of the cycles, concomitant DMARDs were used in combination, being MTX plus leflunomide the most frequent.

Response Duration

As it is shown in Figure 1A, there was an average disease activity improvement after rituximab administration at each cycle, although the degree of response was clearly heterogeneous. In addition, Figure 1B shows that baseline disease activity was the worst at the first rituximab cycle. Then, although most of the successive rituximab cycles were prescribed on demand when the disease flared, on average, retreatment was administered with lower levels of disease activity than the first cycle.

TABLE 1. Baseline Characteristics of Patients

	RTX Start Year				RTX Cycle Number			Total (n = 114)
	≤2008 (n = 49)	2009–2011 (n = 38)	2012–2014 (n = 27)	P	n ≤ 2 (n = 46)	n ≥ 3 (n = 68)	P	
Female, n (%)	38 (77.6%)	31 (81.6%)	23 (85.2%)	0.720	37 (80.4%)	55 (80.8)	1.000	92 (80.7%)
Age at disease onset, p50 (IQR), y	41 (38–53)	54 (42–63)	54 (42–57)	0.012	54 (41–62)	46 (39–56)	0.041	50 (40–59)
Age at RTX start, p50 (IQR), y	56 (47–64)	64 (55–74)	60 (54–67)	0.061	64 (52–70)	58 (49–66)	0.096	60 (51–69)
RA complications, n (%)								
0	29 (59.1%)	19 (50.0%)	20 (74.1%)	0.119	30 (65.2%)	38 (55.9%)	0.431	68 (59.7%)
1–2	19 (38.8%)	19 (50.0%)	6 (22.2%)		16 (34.8%)	28 (41.2%)		44 (38.6%)
>2	1 (2.1%)	0 (0.0%)	1 (3.7%)		0 (0.0%)	2 (2.9%)		2 (1.75%)
Comorbidities, n (%)								
0–1	36 (73.5%)	23 (60.5%)	25 (93.6%)	0.012	33 (71.4%)	51 (75.0%)	0.829	84 (73.7%)
≥2	13 (26.5%)	15 (39.5%)	2 (7.4%)		13 (28.3%)	17 (25.0%)		30 (26.3%)
RF and/or ACPA positive (%)	43 (87.8%)	38 (100%)	25 (93.6%)	0.065	41 (89.1%)	65 (95.6%)	0.265	106 (92.8%)
Previous DMARDs, p50 (IQR)	2 (1–3)	2 (1–3)	2 (1–3)	0.287	2 (1–3)	2 (1–3)	0.754	2 (1–3)
Previous BT, p50 (IQR)	1 (1–2)	1 (1–2)	1 (1–2)	0.654	2 (1–2)	1 (1–2)	0.692	1 (1–2)
RTX as first biologic-line therapy, n (%)	10 (20.4%)	9 (23.7%)	3 (11.1%)	0.289	7 (15.2%)	15 (22.1%)	0.066	22 (19.3%)
DAS28 at cycle 1, p50 (IQR)	5.3 (4.8–6.0)	5.4 (4.7–6.0)	5.3 (4.6–5.7)	0.576	5.1 (4.6–5.9)	5.4 (4.8–6.0)	0.228	5.3 (4.7–5.9)
HAQ at cycle 1, p50 (IQR)	1.5 (0.8–1.6)	1.3 (0.8–1.8)	1.1 (0.8–1.8)	0.940	1 (0.6–1.6)	1.6 (0.8–1.8)	0.355	1 (0.5–1.6)

p50 indicates 50th percentile or median; BT, biological therapies; HAQ, Health Assessment Questionnaire.

TABLE 2. Concomitant DMARDs in Rituximab Cycles

	RTX by Start Year				RTX by Cycle Number			Total (n = 114)
	≤2008 (n = 225)	2009–2011 (n = 129)	2012–2014 (n = 55)	P	n ≤ 2 (n = 194)	n ≥ 3 (n = 215)	P	
MTX	116 (51.6%)	62 (48.1%)	33 (60.0%)	0.337	102 (52.9%)	109 (50.7%)	0.766	211 (51.6%)
Leflunomide	73 (32.4%)	58 (45.0%)	15 (27.3%)	0.024	67 (34.5%)	79 (36.7%)	0.680	146 (35.7%)
Hydroxychloroquine	22 (9.8%)	7 (5.4%)	2 (3.6%)	0.187	14 (7.2%)	17 (7.9%)	0.853	31 (7.6%)
Sulfasalazine	0 (0.0%)	11 (8.5%)	1 (1.8%)	0.000	6 (3.1%)	6 (2.8%)	1.000	12 (2.9%)
Other DMARDs	7 (3.1%)	3 (2.3%)	0 (0.0%)	0.544	7 (3.6%)	3 (1.4%)	0.203	10 (2.4%)
RTX monotherapy	25 (11.1%)	20 (15.5%)	13 (23.6%)	0.054	33 (17.0%)	25 (11.6%)	0.155	58 (14.2%)

RTX indicates rituximab; Other DMARDs, cyclosporine, azathioprine.

Response duration to rituximab could only be determined in 314 cycles administered on demand. Median response duration was 10 months (IQR, 7–13). Because there were some differences in the use of rituximab along the 3 periods, we decided to perform a multivariable analysis to determine which variables better explained response duration in our study. The best-fitted model (Table 3) showed that older age and higher number of rituximab cycles were significantly associated with longer response duration. Of interest, response duration was almost 3 months shorter in seronegative than in seropositive patients, although the differences did not reach statistical significance (Table 3). Finally, when rituximab was used as the third or even later line of biological therapy, the response duration was almost 2 months shorter than in those cycles in which rituximab was used as first or second line, although statistical significance was not reached (Table 3).

Interestingly, the variable dose per cycle was not significantly associated with response duration. Furthermore, we estimated the mean response duration for 1000 mg and 2000 mg rituximab cycles adjusted for the variables included in the model shown in Table 3. As Figure 2 shows, the differences in response duration were negligible. Other variables such as sex, date of rituximab start, or use in monotherapy were not associated with response duration either. Nevertheless, female sex and use of rituximab in monotherapy showed a trend to lower response duration

(Supplemental Digital Content 4, <http://links.lww.com/RHU/A128>). When rituximab was used in combination with DMARDs, there were no relevant differences between the different drugs.

Reasons for Rituximab Withdrawal

Of 114 patients that started rituximab because of active RA, 60 (52.6%) were still under this treatment at December 2015, with a median follow-up of 4.80 years (IQR, 2.15–7.17). Withdrawal from rituximab was due to ineffectiveness in 18.4% of cases (n = 21), adverse events in 7.0% (n = 8), and other reasons such as lost follow-up or non-rituximab-related deaths in 22.0% (n = 25).

Focusing on discontinuation caused by ineffectiveness, 71.4% patients stopped after first or second rituximab cycles (n = 15), 23.8% after 3 to 5 cycles (n = 5) and 1.8% afterward (n = 1) (P = 0.002). Biological line in which rituximab was used did not seem to be related with ineffectiveness as the reason for discontinuation (P = 0.805).

DISCUSSION

RITAR, a real-life observational study that described different rituximab strategies used during 11 years, provides significant information about how the use of this drug has evolved in our center since its approval for RA treatment. We observed a tendency to

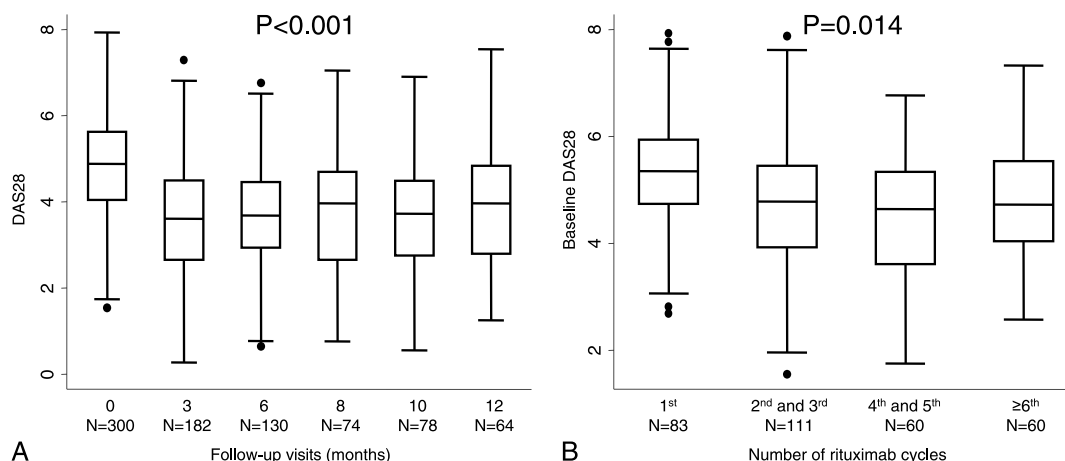


FIGURE 1. Evolution of disease activity with rituximab treatment in RITAR. A, Average disease activity assessed with DAS28 by follow-up visit. B, Baseline disease activity at different rituximab cycles. Data are presented as interquartile range (p75 upper edge, p25 lower edge, p50 midline), p95 (line above the box), and p5 (line below the box). Dots represent the outliers. Statistical significance was estimated with the *nptrend* Stata command, which is an extension of the Wilcoxon rank-sum test that performs a nonparametric test for trend across ordered groups.

abandon the fixed retreatment every 6 months schedule in favor of the on demand use. In addition, the recommended rituximab dose of 2000 mg per cycle was frequently replaced by 1000 mg per cycle administered as a single infusion, especially beyond the third cycle. The most frequent pattern consisted on starting rituximab 2000 mg in the first and second cycles and then reducing to rituximab 1000 mg per cycle in successive retreatments. The main reasons for this schedule are cost-saving and the attempt to reduce adverse effects such as hypogammaglobulinemia and infections.¹² This strategy was similar to that used in the SMART trial, a French study that demonstrated noninferiority in different rituximab schedules: 2000 mg per cycle versus a first course rituximab 2000 mg followed by rituximab 500 mg \times 2 in the consecutive ones.⁵ In addition, a meta-analysis supported similar efficacy of low- versus high-dose rituximab in different subsets of patients.⁴ Comparing to SMART strategy, RITAR treatment schedule has advantages in terms of better cost-effectiveness¹³ and patient comfort, because low-dose cycles were administered as a single infusion instead of 2 infusions of 500 mg.⁵

Rituximab was mainly used as second-line biological therapy. Nevertheless, rituximab was prescribed as first-line biological therapy in 1 of 5 patients, which is a remarkable proportion. We could not determine the reasons for this; probably cost-saving, anti-TNF contraindication, and preference due to patient lifestyle are some of the possibilities. In any case, recently, the ORBIT trial, a head-to-head adalimumab versus rituximab randomized controlled study, showed that rituximab is noninferior to TNF inhibitors in patients naive to biological treatment.¹⁴ In addition, in a long-term Finnish study, almost 28% of patients had never used biologics before rituximab.¹⁵

In our study, rituximab was widely administered with 1 or more concomitant DMARDs being the most frequently used MTX and/or leflunomide. Previous evidence supports the use of leflunomide in this context.^{2,16} Twelve percent of our rituximab cycles were prescribed without concomitant DMARD. This is lower than another Spanish cohort in which rituximab monotherapy was used in 29% of patients.¹⁷ Interestingly, rituximab monotherapy has increased in our center from 11.1% to 23.6% in recent years. The reasons for this trend are unclear and should be analyzed, because lower response magnitude and duration have been described when rituximab is used as monotherapy.¹⁸

TABLE 3. Variables Associated With Response Duration (Months) to Rituximab

	β -coefficient (95% CI)	P
Age at RTX start, y		
<45	Reference	-
45–65	2.32 (–0.49 to 5.13)	0.106
>65	3.63 (0.71 to 6.56)	0.015
Total no. RTX cycles administered		
<3	Reference	-
≥ 3	2.01 (0.66 to 3.35)	0.004
RF and/or ACPA status		
Negative	Reference	-
Positive	2.69 (–0.44 to 5.82)	0.092
No. previous biological therapies		
<3	Reference	-
≥ 3	–1.83 (–3.77 to 0.12)	0.065

CI indicates confidence interval; RTX, rituximab.

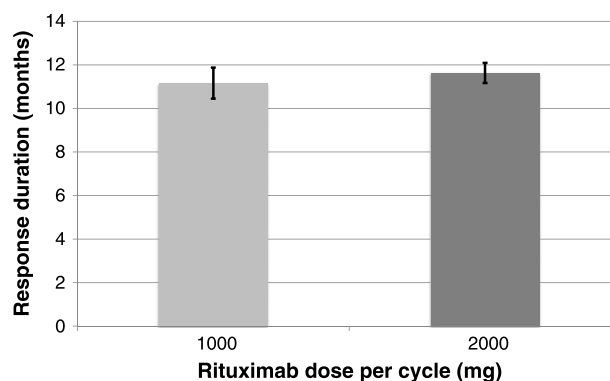


FIGURE 2. Response duration by dose of rituximab. Data are shown as the prediction of the mean response duration in months (top of the histograms) and its 95% confidence intervals (bars) adjusted by the relevant variables included in the multivariable analysis provided in Table 3 (for further information, see *Statistical Analysis* section).

Average rituximab response duration in our patients was 10 months, which is in agreement with the data reported in the literature, ranging from 8.5 months in SMART⁵ and RESET¹⁹ trials to 11 to 13 months observed in a long-term real-life Finnish study.¹⁵ However, the longer time to retreatment in Finnish patients led to disease flare in a significant proportion of patients. The SMART study showed a time to retreatment 1 month shorter than ours, but a similar time to retreatment in the rituximab 1000 mg course (8.6 months) than in 2000 mg per cycle strategy (8.4 months) in the 2-year follow-up. This later finding has also been observed in our study.

In our multivariable model, the variables significantly associated with longer response duration were cycles later than second and age higher than 65 years. These are likely indication biased because those patients with the worst response to rituximab were withdrawn before the third cycle. In addition, we probably delayed rituximab retreatment in elderly patients because of safety reasons.

Additional variables associated to a trend to longer response duration in our study were seropositivity (RF and/or ACPA) and previous treatment with 2 or less biological therapies. On average, seropositive patients showed 3 months longer response duration than seronegative ones. This is in accordance with previous studies.^{7,8,17} It is feasible that the pathogenesis of RA in those patients with autoantibodies is more dependent on B-cells, thus explaining their better response to rituximab.³ Furthermore, those patients that received 3 or more previous biological lines experienced almost 2 months shorter response duration than those that were treated with rituximab in an earlier biological line. This is again in agreement with previous reports and the well-known lower response to RA treatments in more refractory patients.¹⁷

Our study has some limitations commonly present in retrospective observational studies: missing data, high percentage of unexplained lost cycles from follow-up, indication bias, and so on. However, this kind of study offers complementary information to that obtained in clinical trials, because observational studies are able to provide data from real-life patients that are excluded from clinical trials and schedules of treatment that are different from the conventional approved ones.

In summary, our data suggest that, after a successful first cycle of 2000 mg, retreatments with rituximab can be scheduled as cycles of 1000 mg single infusion, because a lower number of B-lymphocytes are detected at early phases of relapse when this drug is used on demand (Lopez et al, unpublished data). In our experience, this retreatment schedule provides median response duration of 10 months, resulting in a comfortable schedule of treatment

with acceptable control of disease activity in most patients. Rituximab use in seropositive patients, especially if it is applied as first or second biological line, seems to provide longer response duration.

KEY POINTS

Rituximab 1 × 1000 mg cycles in on demand retreatment schedule is useful for maintaining response in responder RA patients, providing median response duration of 10 months.

Patients older than 65 years, seropositive disease, and rituximab use in first or second biological line seem to result in longer response duration.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Teresa Velasco, BSN, for her help in collecting data; Tomás Gallego, PharmD, and Alberto Morell, PharmD, for the pharmacy compounding data; and Alicia Humbria, MD, PhD, Rosario García-Vicuña, MD, PhD, Ana M. Ortiz, MD, PhD, Esther Patiño, MD, PhD, Eva G. Tomero, MD, and Esther F. Vicente, MD, PhD, for their work at the clinic.

Special thanks to Manuel Gómez-Gutierrez for the writing assistance.

REFERENCES

- Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:492–509.
- Martín Mola E, Hernández B, García-Arias M, et al. Consensus on the use of rituximab in rheumatoid arthritis. A document with evidence-based recommendations. Grupo de Expertos en Rituximab. *Reumatol Clin*. 2011;7:30–44.
- Cambridge G, Torre Ide L. Response to rituximab: has the original hypothesis been confirmed? *Curr Pharm Des*. 2015;21:212–220.
- Bredemeier M, Campos GG, de Oliveira FK. Updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials comparing low- versus high-dose rituximab for rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2015;34:1801–1805.
- Mariette X, Rouanet S, Sibilia J, et al. Evaluation of low-dose rituximab for the retreatment of patients with active rheumatoid arthritis: a non-inferiority randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2014;73:1508–1514.
- Chatzidionysiou K, Lie E, Nasonov E, et al. Effectiveness of two different doses of rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis in an international cohort: data from the CERERRA collaboration. *Arthritis Res Ther*. 2016;18:50.
- Isaacs JD, Cohen SB, Emery P, et al. Effect of baseline rheumatoid factor and anticitrullinated peptide antibody serotype on rituximab clinical response: a meta-analysis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:329–336.
- Martin-Mola E, Balsa A, Garcia-Vicuna R, et al. Anti-citrullinated peptide antibodies and their value for predicting responses to biologic agents: a review. *Rheumatol Int*. 2016;36:1043–1063.
- Gonzalez-Alvaro I, Martinez-Fernandez C, Dorantes-Calderon B, et al. Spanish Rheumatology Society and Hospital Pharmacy Society Consensus on recommendations for biologics optimization in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54:1200–1209.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31:315–324.
- Pan W. Akaike's information criterion in generalized estimating equations. *Biometrics*. 2001;57:120–125.
- Gottenberg JE, Ravaud P, Bardin T, et al. Risk factors for severe infections in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab in the autoimmunity and rituximab registry. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2625–2632.
- Seror R, Mariette X. Cost-effectiveness of rituximab strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2017;389:365–366.
- Porter D, van Melckebeke J, Dale J, et al. Tumour necrosis factor inhibition versus rituximab for patients with rheumatoid arthritis who require biological treatment (ORBIT): an open-label, randomised controlled, non-inferiority, trial. *Lancet*. 2016;388:239–247.
- Valleala H, Korpela M, Hienonen-Kempas T, et al. Long-term real-life experience with rituximab in adult Finnish patients with rheumatoid arthritis refractory or with contraindication to anti-tumor necrosis factor drugs. *J Clin Rheumatol*. 2015;21:24–30.
- Narvaez J, Diaz-Torne C, Ruiz JM, et al. Comparative effectiveness of rituximab in combination with either methotrexate or leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2011;41:401–405.
- Narvaez J, Diaz-Torne C, Ruiz JM, et al. Predictors of response to rituximab in patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response to anti-TNF agents or traditional DMARDs. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29:991–997.
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004;350:2572–2581.
- Haraoui B, Bokarewa M, Kallmeyer I, et al. Safety and effectiveness of rituximab in patients with rheumatoid arthritis following an inadequate response to 1 prior tumor necrosis factor inhibitor: the RESET Trial. *J Rheumatol*. 2011;38:2548–2556.